

Universidade Federal de Rondônia
Departamento de Medicina - Núcleo de Saúde
Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental

André Grecco Carvalho

**DINÂMICA MOLECULAR APLICADA À ANÁLISE ESTRUTURAL DA
HIPOXANTINA-GUANINA-XANTINA FOSFORIBOSIL TRANSFERASE DE
*Plasmodium falciparum***

Porto Velho

2015

Universidade Federal de Rondônia
Departamento de Medicina - Núcleo de Saúde
Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental

André Grecco Carvalho

**DINÂMICA MOLECULAR APLICADA À ANÁLISE ESTRUTURAL DA
HIPOXANTINA-GUANINA-XANTINA FOSFORIBOSIL TRANSFERASE DE
*Plasmodium falciparum***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biologia
Experimental da Universidade Federal de
Rondônia como requisito final para a obtenção
do título de Mestre em Biologia Experimental.

Orientador: Dr. Fernando Berton Zanchi

Porto Velho

2015

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

Carvalho, André Grecco.

C331d

Dinâmica molecular aplicada à análise estrutural da hipoxantina-guanina-xantina fosforibosil transferase de *plasmodium falciparum*. / André Grecco Carvalho, Porto Velho, 2015.

82f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Berton Zanchi

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

1. *Plasmodium falciparum*. 2. Hipoxantina-Guanina-Xantina Fosforibosil Transferase. 3. Dinâmica Molecular. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 616.936

Bibliotecário responsável: Luã Silva Mendonça- CRB11/905

André Grecco Carvalho

**DINÂMICA MOLECULAR APLICADA À ANÁLISE ESTRUTURAL DA
HIPOXANTINA-GUANINA-XANTINA FOSFORIBOSIL TRANSFERASE DE
*Plasmodium falciparum***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biologia
Experimental da Universidade Federal de
Rondônia como requisito final para a obtenção
do título de Mestre em Biologia Experimental.

Trabalho aprovado. Porto Velho, 14 de Abril de 2015:

Titular interno

Dr. Fernando Berton Zanchi

Titular interno

Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira

Titular externo

Dr. Leandro Moreira Dill

Suplente interno

Dr. Andreimar Martins Soares

Suplente externo

Dr. Rudson de Jesus Holanda

Porto Velho

2015

Dedico este trabalho a minha família, principalmente a minha esposa Tiffany e minha filha Letícia, que com paciência toleraram a minha ausência enquanto me dedicava a este, e não menos importantes meus pais Amadeu e Márcia e meus sogros Mário e Maria de Fátima que nos proporcionaram condições financeiras e motivação para seguir em frente em momentos tão turbulentos.

Coraggio, fuggiamos!

Luiz Hildebrando Pereira da Silva

Agradecimentos

As minhas primeiras linhas são de agradecimento a meu mentor e orientador Dr. Fernando Berton Zanchi, adjetivos para descrevê-lo é extensa e todas positivas. Teve um mestre exemplar e foi um mestre exemplar. Suas ordens, opiniões, reclamações e incentivos, me guiaram e termino este mestrado feliz com os resultados obtidos, foram muitos, principalmente profissionais, alcançados durante os dois anos de pós-graduação: 2º colocado no concurso do IPEM-RO; 1º colocado no concurso SEDAM-RO; 1º colocado no processo seletivo GESTEC/NIT-FIOCRUZ-RO. Só falta mais um, o principal, para encerrarmos com chave de ouro esta fase, o título de Mestre em Biologia Experimental. Muito obrigado Professor!

Agradeço aos amigos Alexandre da Silva Almeida, Andreilson e Beto (Ednaldo Teixeira) por sempre reverterem os momentos tensos no laboratório de bioinformática e bioestatística, por compartilhar suas experiências e também por vibrarem com cada passo dado!

Meu muito obrigado aos amigos (mestrandos e doutorandos) que me acompanharam neste mestrado lista exaustiva a qual descrever a importância de cada um levaria mais que 3 páginas, entretanto muito obrigado por suas companhias, vocês foram um dos motivos que trouxeram mais alegria a minha vida! Estou torcendo por vocês!

Agradeço a banca de qualificação Dr. Leandro Moreira Dill, Dr. Leonardo de Azevedo Calderon e Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira, suas opiniões me enriqueceram com idéias. Em especial ao Dr. Leonardo de Azevedo Calderon a qual investiu financeiramente para adquirir um novo servidor, sem isto este trabalho não seria o mesmo.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental, representado pelo coordenador Dr. Alexandre de Almeida e Silva e pelo colegiado, muito obrigado por essa incrível oportunidade e também aos órgãos de fomento CAPES e FAPERO pelo suporte financeiro.

*“...if we were to name the most powerful assumption of all,
which leads one on and on in an attempt to understand life,
it is that all things are made of atoms,
and that everything that living things do can be
understood in terms of the jiggings and wiggings of atoms.”
(Richard P. Feynman, The Feynman Lectures on Physics)*

Resumo

A malária é uma doença parasitária e uma das doenças mais endêmicas do mundo. Estima-se que cerca de 3,4 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção por malária, principalmente em climas tropicais e subtropicais. Atualmente, existem muitos fármacos para tratar a malária, mas o surgimento de cepas resistentes têm apontado para a necessidade do planejamento de novos fármacos contra novos alvos moleculares. Causar a carência de hipoxantina como objetivo de um antimalárico foi validado pela inibição da purina nucleosídeo fosforilase. A falta de hipoxantina mata *Plasmodium falciparum* (*Pf*) em cultura de células e também em infecções de macacos *Aotus*. O parasita da malária humana *Pf* é auxotrófico para purinas e depende da via de salvamento de purinas para a síntese dos seus nucleotídeos. Hipoxantina-Guanina-Xantina Fosforibosil Transferase (HGXPRT) é uma enzima chave no salvamento de purina em *P. falciparum*, tornando-se um alvo potencial para a quimioterapia, *Pf*HGXPRT usa hipoxantina como substrato e produz inosina 5'-monofosfato (IMP). No presente trabalho a técnica de simulação dinâmica molecular (DM) foi utilizada para identificar a base estrutural das interações dos ligantes naturais no sítio de ligação e prever a especificidade do substrato-enzima. Foram analisadas a estrutura do *Pf*HGXPRT apoenzima e em três complexos: hipoxantina (HPA); pirofosfato ion (PP_i); e HPA, PP_i e íon magnésio (Mg). Este é o primeiro trabalho a realizar esta simulação na *Pf*HGXPRT. Para as DM, foram utilizados o campo de força CHARMM22, e o tempo de simulação de 30 ns. Os cálculos de desvio médio quadrático (RMSD), flutuação média quadrática (RMSF) e raio de giro (Rg) foram utilizados para comparação e análise dos sistemas com ligantes em relação a forma livre. Resultados obtidos por este trabalho demonstram que os ligantes HPA e PP_i não são capazes de estabilizar a *Pf*HGXPRT sozinhos, necessitando de todos os ligantes para estabilização estrutural. Análise prévia da simulações com o ligante AGN-PC-02OZ4C demonstram que este estabiliza a estrutura da *Pf*HGXPRT abrindo oportunidade para que este seja testado *in vitro*.

Palavras-chaves: *Plasmodium falciparum*. Hipoxantina-Guanina-Xantina Fosforibosil Transferase. Dinâmica Molecular.

Abstract

Malaria is a parasitic disease and is one of the world's most endemic diseases. It is estimated that about 3.4 billion people live in areas at risk of malaria infection, predominantly in tropical and subtropical climates. Malaria is caused by the single-celled protozoan parasite *Plasmodium*, which infects host liver and red blood cells and is transmitted through the bite of the female *Anopheles* mosquito. Currently there are many drugs to treat malaria, but the emergence of resistant strains of its causative agent have pointed to the need for planning new drugs against new molecular targets. Cause the lack of hypoxanthine aim of an antimalarial has been validated by inhibition of purine nucleoside phosphorylase. Hypoxanthine depletion kills *Plasmodium falciparum* *Pf* in cell culture and in Aotus monkey infections. The human malaria parasite *Pf* is auxotrophic for purines and relies on the purine salvage pathway for the synthesis of its purine nucleotides. Hypoxanthine–guanine–xanthine phosphoribosyltransferase (HGXPRT) is a key purine salvage enzyme in *P. falciparum*, making it a potential target for chemotherapy, *Pf*HGXPRT uses hypoxanthine as substrate and produces inosine 5'-monophosphate (IMP). In the present work we used molecular dynamics simulations (DM) to identify the structural basis of the interactions of the natural ligands in the binding site and predict the specificity of the enzyme-substrate. We analyzed the structure of *Pf*HGXPRT apoenzyme and in three complex: hypoxanthine (HPA); ion pyrophosphate (PP_i); and HPA, PP_i and ion magnesium (Mg). This is the first work to simulate DM in the *Pf*HGXPRT. CHARMM22 was used for force field and a time of 30 ns of simulation. We analyzed root mean square deviation (RMSD), root mean square fluctuation (RMSF) and radius of gyration (Rg) of the complexes in comparison of the free form. Results obtained in this study show that HPA and PP_i alone don't stabilize the *Pf*HGXPRT, requiring all ligands for stabilization of enzyme. An additional analysis simulation with AGN-PC-02OZ4C show that this stabilizes the structure of the *Pf*HGXPRT, this enable an opportunity for tests *in vitro*.

Key-words: *Plasmodium falciparum*. Hypoxanthine–Guanine–Xanthine Phosphoribosyltransferase. Molecular Dynamics.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Classificação dos países	15
Figura 2 – Regiões com casos de malária	16
Figura 3 – O ciclo de Vida do <i>Plasmodium</i> sp.	17
Figura 4 – Metabolismo de purinas em eritrócitos infectados com <i>P. falciparum</i>	21
Figura 5 – Reações catalisadas pela <i>PfHGXPRT</i>	23
Figura 6 – Algoritmo geral da dinâmica molecular	26
Figura 7 – Energia versus etapas da dinâmica molecular	26
Figura 8 – Tipos de energias potenciais empíricas	29
Figura 9 – Condições Periódicas de Contorno	32
Figura 10 – Representação em 3D da estrutura depositada 3OZF	37
Figura 11 – Estrutura 3D da <i>PfHGXPRT</i> preparada para a DM	39
Figura 12 – RMSD da <i>PfHGXPRT</i>	41
Figura 13 – Raio de giro da <i>PfHGXPRT</i>	42
Figura 15 – Regiões com flutuações espaciais destacadas	43
Figura 14 – RMSF da cadeia A da <i>PfHGXPRT</i>	44
Figura 16 – RMSD dos ligantes	45
Figura 17 – Superposição de estruturas 3D na região entre os resíduos 115 a 125	45
Figura 18 – Conformações do monômero A da <i>PfHGXPRT</i> no sistema 3	46
Figura 19 – Interações entre os ligantes e a <i>PfHGXPRT</i>	48
Figura 20 – Ligante AGN-PC-02OZ4C	52
Figura 21 – RMSD da <i>PfHGXPRT</i>	52
Figura 22 – Raio de giro da <i>PfHGXPRT</i>	53
Figura 23 – RMSF da cadeia A da <i>PfHGXPRT</i>	54
Figura 24 – Local de ligação da AGN-PC-02OZ4C	56

Lista de tabelas

Tabela 1 – Ligantes utilizados na DM	36
Tabela 2 – Parâmetros iniciais da DM calculados	38
Tabela 3 – Interações entre o monômero A do sistema 4 e a HPA	48
Tabela 4 – Interações entre o monômero A do sistema 4 e o PP_i	50
Tabela 5 – Interações entre o monômero A do sistema 5 e o ligante AGN-PC-02OZ4C .	55
Tabela 6 – Interações entre o monômero A do sistema 5 e o PP_i	57

Lista de abreviaturas e siglas

ACT	<i>Artemisinin-combination therapies</i>
ADA	Adenosina deaminase
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AdS	Adenil-succinato
AdSL	Adenil-succinato liase
AdSS	Adenil-succinato sintetase
AK	Adenosina quinase
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPDA	Adenosina 5'-monofosfato deaminase
APRT	Adenosina fosforibosil transferase
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
DM	Dinâmica molecular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRBE	Desenho Racional de Fármacos Baseado em Estrutura
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GAMESS	General Atomic and Molecular Electronic Structure System
GMM	<i>Global malaria mapper</i>
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GMPs	Guanosina 5'-monofosfato sintetase
HGPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
HGXPRT	Hipoxantina-guanina-xantina fosforibosil transferase
IMP	Inosina 5'-monofosfato
IMPDH	Inosina 5'-monofosfato dehidrogenase

LIE	<i>Linear interaction energy</i>
MTA	Metiltioadenosina
MTI	Metiltioinosina
NAMD	<i>Nanoscale Molecular Dynamics</i>
OMS	Organização mundial de saúde
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malariae</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P. ovale</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
PHIL	<i>Public health image library</i>
RESP	<i>Restrained electrostatic potential</i>
Rg	Raio de giro
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
RMSF	<i>Root-mean-square fluctuation</i>
RNA	<i>Ácido ribonucleico</i>
VMD	<i>Visual molecular dynamics</i>
WHO	<i>World health organization</i>
XMP	Xantosina 5'-monofosfato

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	MALÁRIA	15
1.1.1	Epidemiologia	15
1.1.2	Características biológicas	16
1.1.3	Quimioterapia e resistência	17
1.2	METABOLISMO DAS PURINAS	20
1.3	HGXPRT DE <i>Plasmodium falciparum</i>	22
1.4	DESENHO RACIONAL DE FÁRMACOS	24
1.5	DINÂMICA MOLECULAR	24
1.5.1	Algoritmos integradores	26
1.5.2	O campo de força CHARMM	27
1.5.3	NpT <i>ensemble</i>	30
1.5.4	Os métodos de corte e <i>Particle Mesh Ewald</i>	30
1.5.5	Condições periódicas de contorno	31
1.5.6	<i>Constraints</i> e <i>Restraints</i>	31
1.5.7	Dinâmica molecular aplicada ao planejamento de fármacos	32
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	PROTOCOLO DE DINÂMICA MOLECULAR	36
3.2	PROTOCOLO DE COLETA E GERAÇÃO DE DADOS	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	ESTABILIDADE E FLEXIBILIDADE	41
4.2	INTERAÇÕES DA <i>Pf</i> HGXPRT COM A HPA E O ÍON PP_i	47
4.3	ESTABILIDADE ESTRUTURAL COM O LIGANTE AGN-PC-02OZ4C	52
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVA	59
	Referências	60
	APÊNDICE A – OPTIMIZE.INP HIPOXANTINA	69
	APÊNDICE B – ENERGY.INP HIPOXANTINA	70

APÊNDICE C – PROT.PGN APOENZIMA	71
APÊNDICE D – GERAÇÃO DOS ARQUIVOS E PARÂMETROS . . .	72
APÊNDICE E – PROT_EQ.CONF APOENZIMA	73
APÊNDICE F – PROT_PROD_0-2_5.CONF APOENZIMA	77
APÊNDICE G – NOVOSCRIP.TCL	79
APÊNDICE H – RMSD DOS MONÔMEROS DA <i>PFHGXPRT</i>	81
ANEXO A – MAKERESP	83

1 INTRODUÇÃO

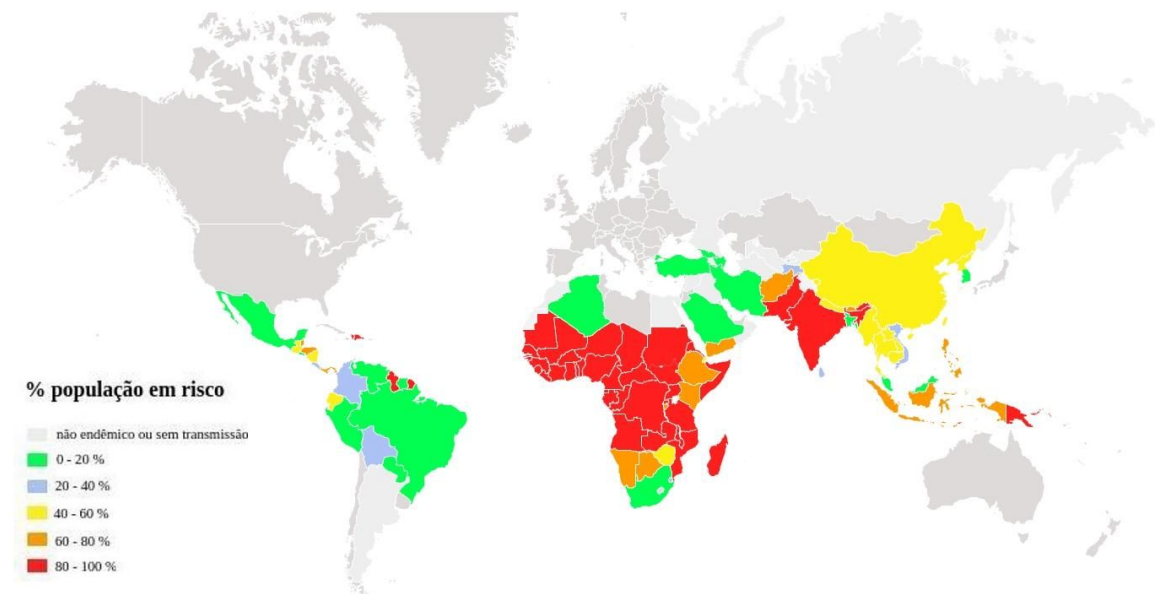
1.1 MALÁRIA

1.1.1 Epidemiologia

A malária é uma doença parasitária e uma das mais endêmicas no mundo. Atualmente a OMS estima que 3,2 bilhões de pessoas vivem em áreas sob o risco de infecção por malária, destes 1,2 bilhões considerados de alto risco, predominando regiões de clima tropical e subtropical. Em 2014 97 países e territórios são considerados como endêmicos, a figura 1 traz a porcentagem da população em risco de adquirir malária em cada país (WHO, 2014a).

No mundo entre os anos de 2000 e 2013 estimou-se uma redução de mortalidade de 47% em todos os grupos etários, sendo 53% em crianças menores de cinco anos. Em 2013 foram estimadas 584.000 de mortes. Nas Américas ocorreu uma redução do número de casos de malária de 64% (1,2 milhões em 2000 para 427.000 em 2013), situação observada em todos os países endêmicos com exceção de Guiana, Haiti e Venezuela onde ascendeu o número de casos. O número de mortes na região reduziu de 390 em 2000 para 82 em 2013. O Brasil acompanha as tendências mundiais de redução de casos e mortes porém é líder em valores absolutos nas Américas representando 42% dos casos registrados e 50% de mortes desta região em 2013 (WHO, 2013; RODRÍGUEZ-MORALES; PANIZ-MONDOLFI, 2014; WHO, 2014a).

Figura 1 – Classificação dos países



Mapa demonstrando a porcentagem da população sob o risco de adquirir malária em cada país.

Fonte: Adaptado de GMM (2014)

No Brasil em 2010, aproximadamente 97% dos casos de Malária se concentraram em seis estados da região amazônica: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia e Roraima. Os outros três estados da região amazônica Maranhão, Mato Grosso e Tocantins foram responsáveis por menos de 3% dos casos de Malaria no país. A maioria dos casos ocorre em áreas rurais, mas há registro da doença também em áreas urbanas (BRASIL, 2010). Recentemente estimou-se que 20% da população reside em área de risco e a ocorrência é principalmente na Região da Amazônia Legal (Figura 2). Quase todos os casos de malária são confirmados e 18% foram causados pelo agente etiológico *Plasmodium falciparum* (WHO, 2014a)

Figura 2 – Regiões com casos de malária



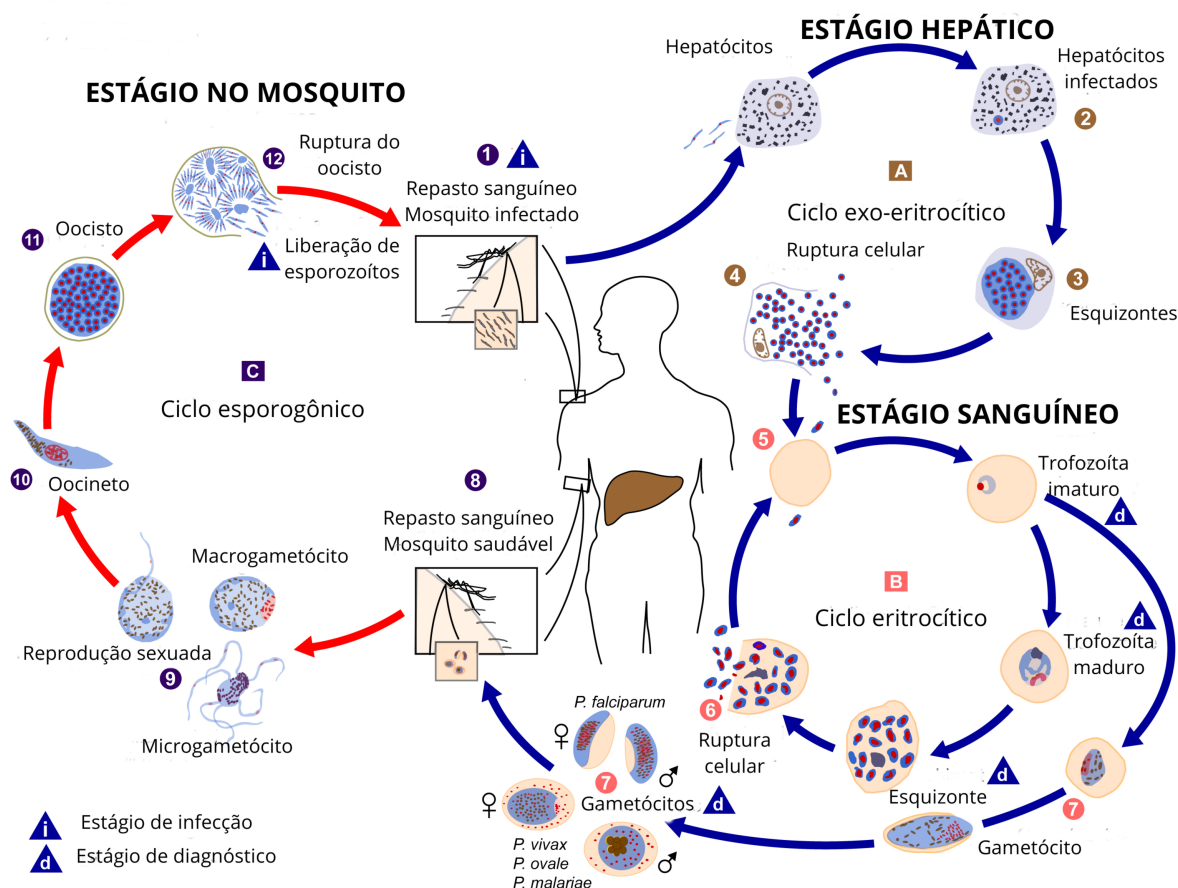
Mapa demonstrando a densidade de casos de malária no Brasil em 2013

Fonte: WHO (2014a)

1.1.2 Características biológicas

A malária é ocasionada pelo protozoário do gênero *Plasmodium* da família *Plasmodiidae* do filo *Apicomplexa*, 5 espécies são capazes de infectar o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. A transmissão de um humano a outro é pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Podem ocorrer outras formas de transmissão como transfusão sanguínea, transplante de órgãos, uso compartilhado de agulhas, e via congênita no momento do parto (DI SANTI; BOULOS, 1999). A figura 3 mostra o ciclo de vida do *Plasmodium* sp. no hospedeiro invertebrado (mosquito *Anopheles*) e no hospedeiro humano.

Os primeiros sintomas de malária ocorrem geralmente entre 9 e 14 dias depois de um mosquito inocular o parasita no hospedeiro. A malária caracteriza-se inicialmente por sintomas inespecíficos, tais como dores de cabeça, fadiga, febre e náuseas (WHO, 2010), em regiões onde a malária não é comum estes sintomas podem ser confundidos como uma gripe, resfriado ou outras infecções comuns (CDC, 2012), como solução existem diversos métodos de diagnósticos para o gerenciamento de casos sendo os mais utilizados: Gota espessa, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e Reação em cadeia da polimerase (PCR).

Figura 3 – O ciclo de Vida do *Plasmodium* sp.

Durante a alimentação, (1) a fêmea infectada do mosquito *Anopheles* inocula os esporozoítos no homem que infectam células hepáticas, (2) iniciando o ciclo pré-eritrocítico; (3) o parasita multiplica-se formando os chamados esquizontes; (4) as células hepáticas contendo esquizontes se rompem liberando os merozoítos; (5) os merozoítos invadem os glóbulos vermelhos iniciando o ciclo eritrocítico, que dá origem aos trofozoítas que subsequentemente se diferenciarão em esquizontes; (6) os esquizontes, após ruptura dos glóbulos que os contêm, liberam merozoítos que invadem outros glóbulos vermelhos; (7) alguns parasitas evoluem para formas sexuais masculina (microgametócito) e feminina (macrogametócito); (8) os mosquitos, ao alimentarem-se em pacientes infectados, ingerem os gametócitos; (9) os gametócitos evoluem para gametas e o microgameta penetra o macro, formando o zigoto que evolui para oocineto móvel, (10) que penetra a parede do estômago do mosquito e encista-se formando o oocisto, (11) onde passa a esporogonia, dando origem aos esporozoítas (12), que invadem as glândulas salivares do mosquito

Fonte: Adaptado de PHIL (2002)

1.1.3 Quimioterapia e resistência

Existem diversos antimaláricos disponíveis para o tratamento de infecções por *Plasmodium* sp. que podem ser classificados por dois critérios: 1) com base na classe química e/ou no principal mecanismo de ação, ou 2) com base no local de ação no ciclo vida do parasita, sendo neste caso classificados em esquizonticida sanguíneo quando atua sobre a fase intra-eritrocitária impedindo a proliferação dos parasitas até esquizonte; esquizonticida tecidular quando previne o desenvolvimento de esquizontes hepáticos; hipnozoitocida se atua sobre os hipnozoítos hepáticos; gametocida quando destrói as formas sexuais (FRÉDÉRICH et al., 2002). Abaixo segue a descrição de alguns desses antimaláricos.

Cloroquina

Classificada como 4-aminoquinoleína é um esquizontícida sanguíneo e gametocída, foi amplamente utilizado depois da segunda guerra, contudo após os anos 50 cepas de *P. falciparum* foram relatadas como resistentes, *P. vivax* somente foi relatada como resistente em 1989 (WELLEMS; PLOWE, 2001), Maguire e colaboradores (2002) relatam a resistência da *P. malariae* à cloroquina. O mecanismo de ação da cloroquina baseia-se na inibição da heme polimerase do *Plasmodium* sp. e ainda na complexação com a heme, gerando um produto altamente tóxico para o *Plasmodium* sp. (TEKWANI; WALKER, 2005).

Mefloquina

Classificada como 4-metanolquinoleína é um esquizontícida sanguíneo e gametocída. É utilizado para tratar e prevenir *P. falciparum* e *P. vivax*. A medicação é efetiva contra cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina (BLOLAND, 2001). Também é efetivo contra o gametócitos de *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, rompendo com o ciclo de vida da malária impedindo a transmissão para outros mosquitos e consequentemente outros humanos (WHO, 1995). O mecanismo de ação da mefloquina é desconhecido, porém suspeita-se que age ligando-se a heme gerando um complexo que danifica a membrana do parasita e outros componentes celulares (DASSONVILLE-KLIMPT et al., 2011). A resistência a mefloquina é principalmente relatada no sudeste asiático, porém, há relatos de ocorrência na América do sul e no leste da África, neste último com menor frequência, há ainda descrição de resistência do *P. falciparum* no distrito Surat na Índia. A resistência é associada ao aumento do número de cópias do gene *pfmdr-1*. (FAROOQ; MAHAJAN, 2004; PRICE et al., 2004)

Quinina

Classificada como metanolquinoleína é um esquizontícida sanguíneo. É usado como linha alternativa no tratamento da malária (BRIOLANT et al., 2011). O mecanismo de ação é desconhecido, porém, há hipótese que este altera a capacidade do parasita de quebrar e digerir hemoglobina, ocasionando a morte pela elevação de níveis tóxicos de hemoglobina degradada em si (OLLIARO; YUTHAVONG, 1999). A resistência a quinina é reportado no Sudeste da Ásia e Oceania; na América do sul e África há relatos com frequência menor. A resistência, como a mefloquina, é associado ao número de cópias do gene *pfmdr-1* (FAROOQ; MAHAJAN, 2004).

Atovaquona e Proguanil

Classificados como hidroxinaftoquinona e biguanida respectivamente são equizontícidas sanguíneos. Atovaquona e Proguanil são fabricados em combinação com o nome Malarone[®] tem ações em mecanismos diferentes, atovaquona inibe o transporte de elétrons na mitocôndria no nível do complexo citocromo-bc1 do parasita (LOOAREESUWAN et al., 1999), proguanil exerce seu efeito através do metabólito

cicloguanil, inibidor de dihidrofolato redutase, a inibição desta enzima rompe com a síntese deoxitimidilato (GREGSON; PLOWE, 2005). A resistência do *P. falciparum* a atovaquona são relatadas por mutações no gene do citocromo-b (SRIVASTAVA; VAIDYA, 1999; KORSINCZKY et al., 2000; SCHWÖBEL et al., 2003).

Primaquina

Classificado como 8-aminoquinoleína é um gametocida, hipnozoitícid e esquizontícid tecidular. É utilizado no tratamento e prevenção da recaída de *P. vivax* e *P. ovale* (ASHLEY; RECHT; WHITE, 2014) e nestes casos deve ser utilizado em conjunto com outro medicamento que seja um esquizontícid sanguíneo (BAIRD, 2011), é utilizado também como gametocida de *P. falciparum* (FERNANDO; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2011). O mecanismo de ação não está elucidado, porém a primaquina é conhecido por desregular os processos metabólicos na mitocôndria plasmodial, uma das hipóteses é a interferência na função da ubiquinona como transportadora de elétrons na cadeia respiratória, outra hipótese é a produção de metabólitos altamente reativos que podem gerar oxidantes potencialmente tóxicos (HILL et al., 2006). A resistência a primaquina não é trivial de quantificar já que é utilizada em conjunto com um esquizontícid sanguíneo, porém algumas falhas ocorridas são atribuídas ao regime do tratamento (FERNANDO; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2011).

Artemeter e Lumefantrina

Classificados como artemisininas são esquizontícid sanguíneo. Artemeter e Lumefantrina são fabricados em combinação com o nome de Coartem[®]. Artemeter é metabolizada por enzimas da família do citocromo P450 (CYP450 2B6 e CYP450 3A4) em dihidroartemisina que é um metabólito ativo agindo na interação com a heme no vacúolo do parasita resultando em radicais citotóxicos. O exato mecanismo de ação que a Lumefantrina exerce não é conhecido, entretanto dados obtidos sugerem que a mesma inibe a formação hemozoína pela formação de um complexo com a heme induzindo a morte do parasita (BYAKIKA-KIBWIKI et al., 2011).

A resistência aos antimaláricos é um dos fatores que limitam o sucesso do tratamento da malária, sendo responsável pelo último aumento de mortalidade relacionado com a doença, principalmente na África (WHITE, 2004). Fármacos ineficazes levam ao aumento de falhas terapêuticas, o que aumenta o risco de malária grave, incrementando a transmissão. Infecções parcialmente tratadas produzem oito vezes mais gametócitos comparado com infecções tratadas com sucesso (PRICE; NOSTEN, 2001). A resistência tem ainda como consequência imediata um aumento do custo global do controle da doença, pois as falhas terapêuticas, requerem novas consultas nos centros de saúde ou hospitais para diagnóstico e tratamento, resultando na perda de dias de trabalho pelos adultos e absentismo escolar por parte das crianças.

Desde 2001 a OMS recomenda o uso de combinações terapêuticas, preferencialmente, com derivados de artemisinina (ACT - *artemisinin-combination therapies*), no tratamento de malária não complicada por *P. falciparum*. Em 2013, 79 países utilizam a combinação terapêutica com derivados de artemisinina como tratamento de primeira linha (WHO, 2014a). Existem quatro combinações terapêuticas com derivados de artemisinina recomendadas: a combinação de artemeter com lumefantrina e as combinações de artesunato com amodiaquina, sulfadoxina-pirimetamina ou mefloquina.

A resistência a artemisininas foi detectado e confirmado em 5 países do sudeste asiático: Camboja, Laos, Myanmar, Tailândia e Vietnã (WHO, 2014a). A resistência a ambos componentes do ACT foram relatados na província de Pailin no Camboja (WHO, 2013). Devido a altas taxas de falhas na combinação artesunato-mefloquina em Pailin, o tratamento foi modificado para dose única de dihidroartemisina-piperaquina em 2008 e nacionalmente em 2010. Após projeto de contenção, em 2009 o número de pacientes com *P. falciparum* reduziu, porém a pressão sobre as artemisininas continua, a proporção de pacientes tratados com dihidroartemisina-piperaquina que continham parasitemia no terceiro dia ascendeu de 26% para 45% entre 2008 e 2010 (WHO, 2014b). A nova medida de combate adotada foi o tratamento baseado em Atovaquona-Proguanil para esta região. (WHO, 2013). É urgente a validação química de novos alvos e consequentemente a prospecção de novas moléculas que funcionem como quimioterápicos para o tratamento da malária em face ao recente aumento de resistência aos atuais fármacos (WRIGHT et al., 2014).

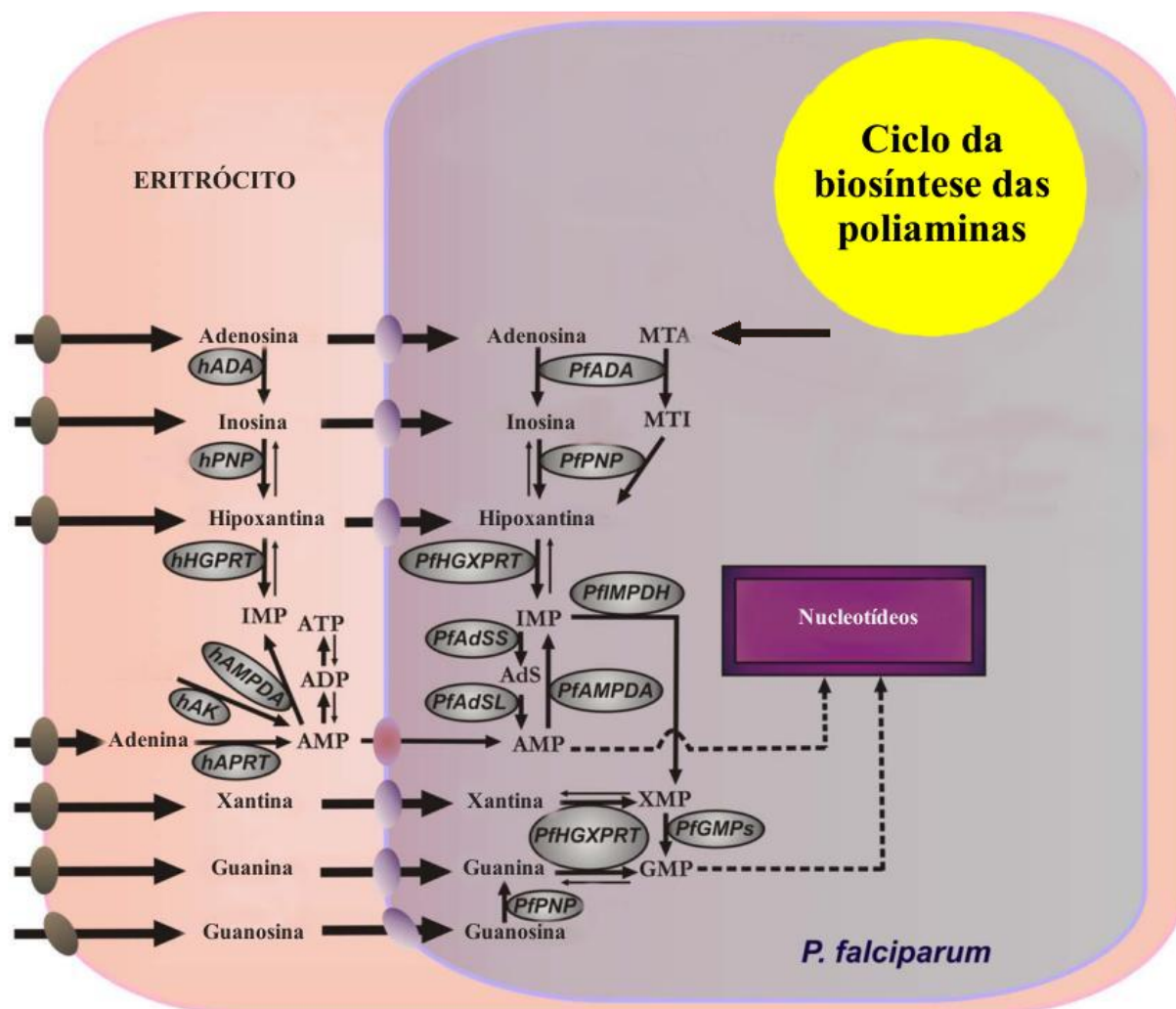
1.2 METABOLISMO DAS PURINAS

As purinas são componentes essenciais para a síntese do DNA e RNA portanto imprescindíveis aos seres vivos. Existem dois mecanismos descritos para a obtenção das mesmas, a via de síntese ou via *de novo*, onde uma quantidade de energia significativa é gasta para a produção de novas moléculas a partir de precursores conhecidos. A segunda via, a de salvamento, é aquela onde as bases provenientes de células mortas, bem como de DNA e RNA não mais utilizados, são recicladas para posterior reutilização. Estudos envolvendo o *P. falciparum* mostraram, que ao contrário de seus hospedeiros, o mesmo não possui uma via de síntese, dependendo exclusivamente da via de salvamento para sua reprodução e manutenção (HASSAN; COOMBS, 1988; SHI et al., 1999; CASSERA et al., 2011).

A via de salvamento de purinas no *P. falciparum* é formado por um sistema complexo de enzimas (Figura 4), contudo estudos relatam que a falta do substrato hipoxantina impede a continuidade desta via e consequentemente matam os parasitas. Berman e Human (1991) demonstram que a degradação da hipoxantina mediada pela Xantina oxidase matam os parasitas *in vitro*. Kicska e colaboradores (2002) expõem que a inibição da Purina nucleosídeo fosforilase (PNP) também matam os parasitas *in vitro*. Cassera e colaboradores (2011) apresentam que as inibições das PNP's do hospedeiro e do parasita, mata o *P. falciparum* em macacos *Aotus*.

Os trabalhos anteriores confluem com a afirmação de Berman, Human e Freese (1991) a qual o suprimento de hipoxantina é crítico para o *P. falciparum*, pois, a sua falta afetaria a produção de inosina 5'-monofosfato (IMP), que é precursor de todos nucleotídeos purínicos do parasita (DOWNIE; KIRK; MAMOUN, 2008).

Figura 4 – Metabolismo de purinas em eritrócitos infectados com *P. falciparum*



AMP, adenosina 5'-monofosfato; ADP, adenosina 5'-difosfato; ATP, adenosina 5'- trifosfato; IMP, inosina 5'-monofosfato; XMP, xantosina 5'-monofosfato; GMP, guanosina 5'-monofosfato; hADA, adenosina deaminase de humano; MTA, metiltioadenosina; MTI, metiltioinosina; AdS, adenil-succinato; hPNP, purina nucleosídeo fosforilase de humano; hHGPRT, hipoxantina-guanina fosforibosil transferase de humano; hAK, adenosina quinase de humano; hAMPDA, adenosina 5'-monofosfato deaminase de humano; hAPRT, adenina fosforibosil transferase de humano; *Pf*ADA, *P. falciparum* adenosina deaminase; *Pf*PNP, *P. falciparum* purina nucleosídeo fosforilase; *Pf*HGXPR, *P. falciparum* hipoxantina-guanina-xantina fosforibosil transferase; *Pf*AMPDA, *P. falciparum* adenosina 5'-monofosfato deaminase; *Pf*IMPDH, *P. falciparum* inosina 5'-monofosfato dehydrogenase; *Pf*GMPs, *P. falciparum* guanosina 5'-monofosfato sintetase; *Pf*AdSS, *P. falciparum* adenil-succinato sintetase; *Pf*AdSL, *P. falciparum* adenil-succinato liase. Traços em negrito em reações reversíveis mostram a tendência da reação. O transporte via membrana é indicado em cada membrana, transportador de nucleosídeos de eritrócitos humanos (marrom), transportador *Pf*NT1 (roxo) e transportador de adenosina 5'-monofosfato (vermelho)

Fonte: Adaptado de Cassera e colaboradores (2011)

A via de salvamento possui três enzimas chaves para a produção de IMP, são elas: 1) Adenosina deaminase (ADA), 2) Purina nucleosídeo fosforilase (PNP) e 3) Hipoxantina-guanina-xantina fosforibosil transferase (HGXPRT) (JERSEY et al., 2011).

A produção de IMP no parasita pode ter origem de substratos diversos, porém, os principais (JERSEY et al., 2011) passam por rotas metabólicas que por fim afinam-se como reagentes da HGXPRT de *P. falciparum* (*PfHGXPRT*). A primeira rota é pelo transporte de hipoxantina do eritrócito para o parasita e a transformação em IMP pela *PfHGXPRT*. A segunda é a desaminação da adenosina pela *PfADA* formando inosina, em seguida sendo transformada em hipoxantina pela *PfPNP* finalizando com a transformação em IMP pela *PfHGXPRT*. A terceira é pelo reciclo da metiltioadenosina (MTA), proveniente da biossíntese das poliaminas, a qual é desaminada pela *PfADA* formando metiltioinosina (MTI), que é transformada em hipoxantina pela *PfPNP* e subsequente em IMP pela *PfHGXPRT* (CASSERA et al., 2011).

Um modo alternativo de produção de IMP pelo *P. falciparum*, sem a necessidade da *PfHGXPRT*, é através do transporte de adenosina 5'-monofosfato (AMP) do eritrócito para o parasita e consequente transformação em IMP pela Adenosina 5'-monofosfato deaminase de *P. falciparum* (*PfAMPDA*), porém, análises dessa rota relatam que para viabilizá-la é necessário altas concentrações de adenosina exógena, causando assim um aumento de concentração de AMP, produzido pela Adenosina quinase do eritrócito humano (hAK) (CASSERA et al., 2008), situação não natural, que faz a produção de IMP depender exclusivamente da *PfHGXPRT*, tornando esta enzima um elo entre os metabólitos exógenos e os nucleotídeos purínicos do parasita, portanto um alvo habilitado para a prospecção de fármacos (CASSERA et al., 2011).

1.3 HGXPRT DE *Plasmodium falciparum*

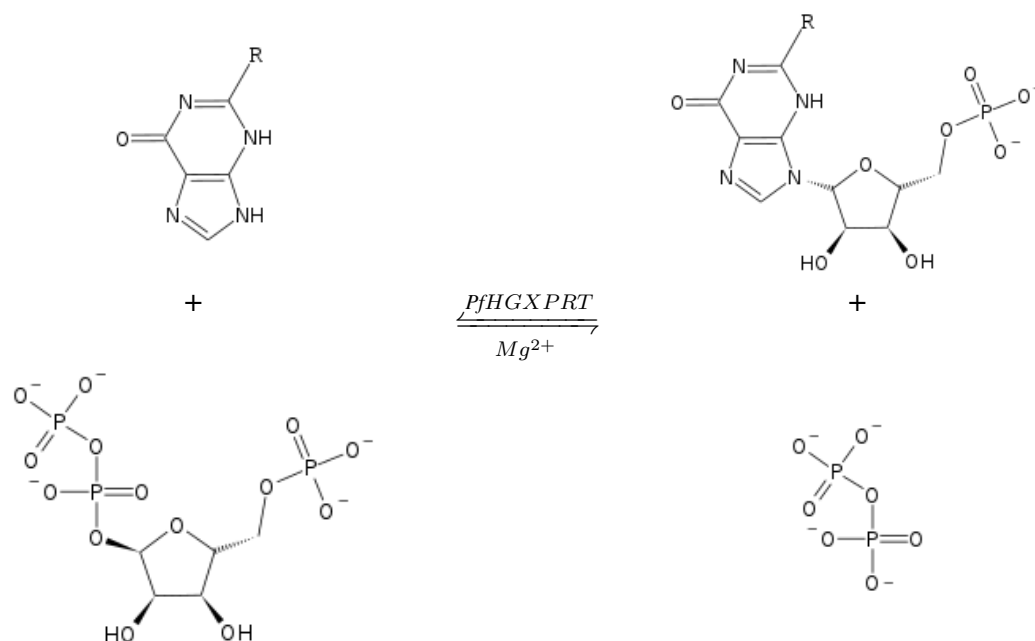
A *PfHGXPRT* catalisa a transferência do grupo fosforibosil, derivado do fosforibosil pirofosfato (PRPP), para uma nucleobase 6-oxopurina, formando seu respectivo nucleosídeo monofosfato mais pirofosfato (PP_i), em uma reação dependente de íons magnésio (Mg), conforme a figura 5 (DUCATI; NAMANJA-MAGLIANO; SCHRAMM, 2013).

O mecanismo cinético da *PfHGXPRT* não é totalmente conhecido, porém, mecanismos já conhecidos da proteína humana (XU; GRUBMEYER, 1998), do esquistossoma (YUAN et al., 1992), do *Tritrichomonas foetus* (MUNAGALA; CHIN; WANG, 1998) e do *Trypanosoma cruzi* (WENCK et al., 2004) provavelmente se aplicam a *PfHGXPRT* (RAMAN et al., 2005; DUCATI; NAMANJA-MAGLIANO; SCHRAMM, 2013), a qual a PRPP liga-se primeiramente na enzima seguido da ligação da base na mesma e a então, formação do produto; a liberação de pirofosfato (PP_i) da enzima precede a do nucleosídeo monofosfato (DUCATI; NAMANJA-MAGLIANO; SCHRAMM, 2013).

A HGPRT humana compartilha de 44% de identidade a sequência de aminoácidos e 76% de similaridade a HGXPRT de *P. falciparum* (RAMAN et al., 2005). A deficiência

genética humana de HGPRT causa a síndrome de Lesch-Nyhan (LESCH; NYHAN, 1964) ou variantes menos severas como a síndrome de Kelley-Seegmiller, necessitando que a prospecção de potenciais fármacos com alvo na *Pf*HGXPRT também sejam testadas na hHGPRT (SHI et al., 1999).

Figura 5 – Reações catalisadas pela *Pf*HGXPRT



Reação da base 6-oxopurina (hipoxantina R=H, xantina R=OH e guanina R=NH₂) mais fosforibosil pirofosfato formando nucleosídeo monofosfato (inosina 5'-monofosfato R=H, xantosina 5'-monofosfato R=OH e guanosina 5'-monofosfato R=NH₂) e pirofosfato em uma reação dependente de magnésio

Fonte: Adaptado de Raman e colaboradores (2005)

As mutações no gene *HPRT1* humano, localizado no cromossomo X, causam uma variedade de sintomas clínicos que variam com o grau de deficiência enzimática da HGPRT (TORRES; PUIG, 2007). A síndrome de Lesch-Nyhan a qual a enzima é completamente deficiente é caracterizada por disfunções cerebrais e hiperuricemia, atualmente são descritas uma gama de mutações no gene *HPRT1* associados a deficiência parcial de HGPRT, sendo que os dados obtidos destas, sugerem que inibições fracas a moderadas na hHGPRT não provam ser tóxicas para o hospedeiro (JERSEY et al., 2011).

Apesar das similaridades entre a *Pf*HGXPRT e hHGPRT, as propriedades diferem significativamente, entre elas a especificidade pelo ligante xantina a qual a enzima do *P. falciparum* possui e a humana não, sendo esta especificidade modulada tanto por resíduos no sítio ativo como fora dele, Raman e colaboradores (2004) demonstraram que a mutação na PHE36 da hHGPRT, resíduo distante do sítio ativo, para LEU resulta em atividade para xantina. Outra diferença são relatos sobre a atividade das enzimas recombinantes, que após a purificação a hHGPRT é altamente ativa em ausência de substrato (XU; GRUBMEYER, 1998), já

*Pf*HGXPRT tem atividade insignificante (KEOUGH et al., 1999).

Uma vez que o alvo está estabelecido e é conhecida sua estrutura como no caso da *Pf*HGXPRT é possível o uso da técnica desenho racional de fármacos baseado em estrutura (DRBE) a qual se ramifica em uma gama táticas, cabendo a cada pesquisador a escolha que se adequa melhor ao seu projeto.

1.4 DESENHO RACIONAL DE FÁRMACOS

Diferente de métodos antigos de prospecção, que se baseiam na triagem cega, o desenho racional de fármacos parte da premissa que a compartimentação de um alvo molecular pode ter valor terapêutico. Neste sentido a necessidade de uma metodologia sistemática, objetivando o estudo do mecanismo de reconhecimento molecular, levaram ao surgimento do desenho racional de fármacos baseado em estrutura (DRBE) (DE MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2007).

Uma vez conhecida a estrutura do alvo molecular com acurácia em detalhes atômicos, é possível a fabricação de pequenas moléculas que se ligam aos sítios do alvo, baseado nas informações estruturais e as interações envolvidas entre o receptor-ligante, alterando a atividade biocatalítica (MACPHERSON, 1994; DE MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2007).

Com a notoriedade do paradigma DRBE várias ferramentas e técnicas, foram concebidas ou adotadas para a tratativa das interações receptor-ligante, entre elas estão *docking molecular*, *virtual screening*, simulações moleculares, métodos de química quântica computacional, método *de novo* para desenho de fármacos etc. (LOUNNAS et al., 2013). Devido a este desenvolvimento e ao crescente número de estruturas 3D de biomoléculas disponíveis, a descoberta de fármacos experimentou um significativo aumento (MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009).

As técnicas de *virtual screening* e *docking molecular* são amplamente utilizadas, o poder e versatilidade destas são auto-evidentes, já que pode ser aplicadas na triagem virtual de moléculas, quanto no refinamento de protótipos, utilizando qualquer lógica que possa ser expressa em termos de propriedades moleculares (LOUNNAS et al., 2013). Entretanto a dinâmica molecular (DM) vem assumindo um papel cada vez maior na prospecção de fármacos, já que possibilita mimetizar um experimento e acompanhá-lo no domínio espaço-temporal, com escalas de espaço indo até alguns milhares de angströms, com precisão atômica, e de tempo até milésimos de segundo, com resolução de femtossegundos (BORHANI; SHAW, 2012).

1.5 DINÂMICA MOLECULAR

Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica computacional que fundamenta-se nos princípios da mecânica clássica e tem o intuito de ajudar na compreensão das propriedades de um conjunto de moléculas, como estrutura e interações microscópicas, as quais não seriam possível ser descritas por outros métodos. Neste contexto, age como uma ponte em dois sentidos:

1) A relação entre a escala microscópica e a escala de tempo com o mundo macroscópico, 2) teórico em relação ao experimental (ALLEN, 2004).

A simulação de DM consiste na solução numérica da equação de movimento:

$$F_i = m_i a_i \quad (1.1)$$

Onde F_i é a força atuando sobre cada átomo do conjunto de moléculas no instante t ; e a_i é a aceleração do i -ésimo átomo de massa m_i . Estando definido o campo de força, calcula-se a derivada de primeira ordem da energia potencial em relação as coordenadas desses átomos:

$$F_i = -\frac{\partial U(r_i)}{\partial r_i} \quad (1.2)$$

Obtendo:

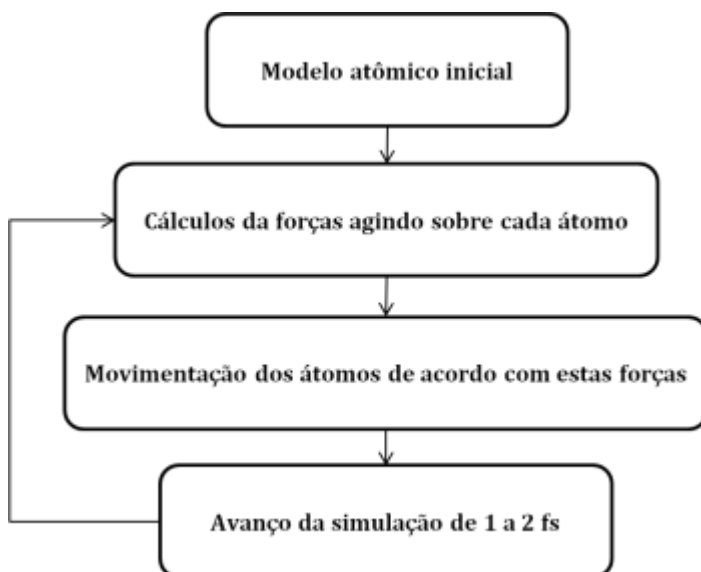
$$-\frac{\partial U(r_i)}{\partial r_i} = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (1.3)$$

Onde $\frac{d^2 r_i}{dt^2} = a_i$.

A integração da equação 1.3 em relação a t fornece as velocidades, uma nova integração fornece as novas posições dos átomos e estes cálculos realizados sucessivamente geram uma trajetória. Nas simulações de DM, entretanto, estas integrais não são obtidas de forma analítica (ex.: $f(x) = x^2$) e sim por métodos do cálculo numérico, na DM, os mesmos são denominados de algoritmos integradores, tema abordado na seção posterior, nestes métodos a integração é dividida em pequenos intervalos de tempo Δt (passos, geralmente 1 a 2 fs), a qual permitem simular os movimentos de maior frequência do sistema como vibrações das ligações (VERLET, 1968 apud ZANCHI, 2009, p.27).

A figura 6 de maneira geral mostra o cálculo da trajetória, partindo de uma estrutura inicial calcula-se as forças agindo sobre cada átomo, a partir desta obtêm-se as acelerações, velocidades e novas posições por meio da solução da equação 1.3, e então avança um passo.

As simulações de sistemas na DM de forma geral são divididas em: a) Minimização, b) Termalização-Equilíbrio e c) Produção. A minimização tem como efeito a remoção de possíveis tensões existentes na configuração inicial. A termalização e equilíbrio tem como objetivo obter uma conformação favorável a uma determinada pressão e temperatura e a produção busca estados acessíveis termicamente (Figura 7) (OLIVEIRA, 2013).

Figura 6 – Algoritmo geral da dinâmica molecular

Fluxograma generalizado mostrando as etapas de cálculo da dinâmica molecular em cada passo durante a simulação.

Fonte: Adaptado de Durrant e McCammon (2011)

Figura 7 – Energia versus etapas da dinâmica molecular

Gráfico apresentando o efeito de cada etapa da dinâmica molecular sobre a energia e seu objetivo principal.

Fonte: Adaptado de Siani (2013)

1.5.1 Algoritmos integradores

Os algoritmos integradores amplamente utilizados são o de Verlet (VERLET, 1968) e *Leap-frog* (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1988), o algoritmo de Verlet utiliza as posições e acelerações ($\frac{d^2 r_i(t)}{dt^2}$) no tempo t e as posições no passo anterior ($t - \Delta t$) e as posições atuais (t)

$$\frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = \frac{F_i(t)}{m_i} \quad (1.4)$$

As posições são obtidas pelo desenvolvimento da série de Taylor

$$r_i(t + \Delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \Delta t^2 \quad (1.5)$$

As velocidades($\frac{dr_i(t)}{dt}$) não interferem diretamente na série anterior pois são eliminadas no desenvolvimento da mesma, porém, devem ser calculadas a fim de obter a energia cinética

$$\frac{dr_i(t)}{dt} = \frac{r_i(t + \Delta t) - r_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad (1.6)$$

O algoritmo *Leap-frog* utiliza dois passos, primeiramente calculando a velocidade no tempo $t + \frac{\Delta t}{2}$:

$$\frac{dr_i(t + \frac{\Delta t}{2})}{dt} = \frac{dr_i(t - \frac{\Delta t}{2})}{dt} + \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \Delta t \quad (1.7)$$

E então as posições são calculadas no tempo $t + \Delta t$:

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \frac{dr_i(t + \frac{\Delta t}{2})}{dt} \Delta t \quad (1.8)$$

Obtendo assim a velocidade no tempo t :

$$\frac{dr_i(t)}{dt} = \frac{\frac{dr_i(t + \frac{\Delta t}{2})}{dt} + \frac{dr_i(t - \frac{\Delta t}{2})}{dt}}{2} \quad (1.9)$$

Além dos algoritmos de Verlet e *Leap-frog* existem outros algoritmos de integração como exemplo, o algoritmo de Beeman (BEEMAN, 1976).

1.5.2 O campo de força CHARMM

O primeiro passo antes de calcular acelerações, velocidades e posições dos átomos é o cálculo de forças atuantes. Na DM as forças são obtidas por meio de cálculos sobre o campo de força (Equação 1.2), o qual é escolhido pelo usuário.

Em química computacional, o campo de força consiste em: 1) uma função padrão definindo como computar as energias e forças em cada partícula do sistema e 2) parâmetros que definem como as relações das posições entre os átomos determinam sua energia. Atualmente existem vários campos de forças publicados, sendo que cada um tem suas peculiaridades de aplicação (ex.: sistema com enzimas, lipídeos, ácidos nucleicos etc.)

O campo de força CHARMM (param22/param27) (MACKERELL et al., 1998; MACKERELL; FEIG; BROOKS, 2004; FOLOPPE; MACKERELL JR., 2000) utilizado neste trabalho é indicado para sistemas proteicos, o mesmo é obtido pelas contribuições da energia potencial dos átomos ligados e dos átomos não ligados, conforme equação abaixo:

$$U_{CHARMM} = U_{ligados} + U_{não-ligados} \quad (1.10)$$

Onde:

$$U_{ligados} = U_{Ligação} + U_{\hat{Angulo}} + U_{Urey-Bradley} + U_{Diedro} + U_{Diedro-impróprio} + U_{CMAP} \quad (1.11)$$

$$U_{n\tilde{a}o-ligados} = U_{LJ} + U_{Eletr\tilde{o}st\tilde{a}tico} \quad (1.12)$$

A energia de ligação ($U_{Ligação}$ Equação 1.13) varia em função da vibração entre os dois átomos ligados.

$$U_{Ligação} = \sum_{Ligações} K_b(b - b^0)^2 \quad (1.13)$$

A energia do ângulo ($U_{\hat{Angulo}}$ Equação 1.14) é função do movimento de cisalhamento entre três átomos ligados.

$$U_{\hat{Angulo}} = \sum_{\hat{Angulos}} K_{\theta}(\theta - \theta^0)^2 \quad (1.14)$$

A energia do diedro ou energia torsional (U_{Diedro} Equação 1.15) é função do ângulo dos planos formados entre quatro átomos ligados sequencialmente. Esta energia favorece conformações que correspondem ao mínimo de energia local. A combinação de ângulos diedros favoráveis em aminoácidos com cadeias laterais é chamada de rotâmeros (LOVELL et al., 2000).

$$U_{Diedro} = \sum_{Diedros} K_{\phi}(1 + \cos(n\phi - \delta)) \quad (1.15)$$

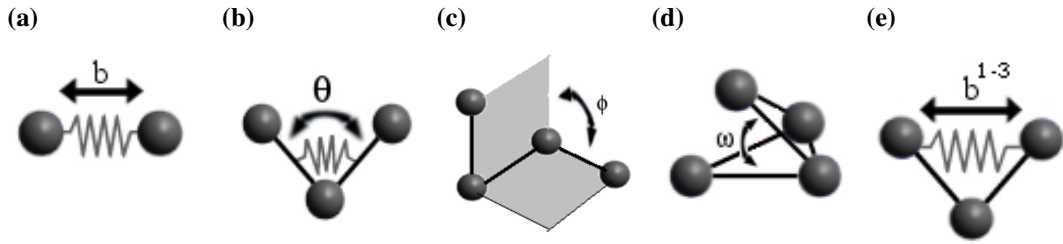
Onde K_{ϕ} é uma constante, n é a multiplicidade, ϕ é a variável angular do diedro e δ é o ângulo de diferença de fase.

A energia do diedro-impróprio ($U_{Diedro-impróprio}$ Equação 1.16) é função do ângulo dos planos formados por quatro átomos ligados não sequencialmente. Esta energia mantém a quiralidade e planaridade de certas moléculas.

$$U_{Diedro-impróprio} = \sum_{Diedros-impr\tilde{o}prios} K_{\omega}(\omega - \omega^0)^2 \quad (1.16)$$

A energia Urey-Bradley ($U_{Urey-Bradley}$ Equação 1.17) (MACKERELL et al., 1998) é função da distância entre dois átomos separados por um átomo (interações 1-3).

$$U_{Urey-Bradley} = \sum_{Urey-Bradley} K_{UB}(b^{1-3} - b^{1-3,0})^2 \quad (1.17)$$

Figura 8 – Tipos de energias potenciais empíricas

a) Energia de Ligação, b) Energia do Ângulo, c) Energia do diedro, d) Energia do diedro impróprio e e) Energia Urey-Bradley.

Fonte: Adaptado de Chipot (2002)

A energia CMAP (U_{CMAP} Equação 1.18) (MACKERELL; FEIG; BROOKS, 2004) trata das conformações da cadeia principal das proteínas. Esta energia depende dos ângulos diedrais ϕ e ψ .

$$U_{CMAP} = \sum_{\text{Resíduos}} u_{CMAP}(\phi, \psi) \quad (1.18)$$

Nas equações acima com funções harmônicas (ex.: $U = \sum K(x - x^0)^2$), os elementos K_b , K_θ , K_ω e K_{UB} são constantes. A distância b , o ângulo θ , o ângulo ω e a distância b^{1-3} são as variáveis da função. Os elementos b^0 , θ^0 , ω^0 e $b^{1-3,0}$ são constantes de equilíbrio.

As interações entre átomos não ligados tem contribuições da energia eletrostática (Coulomb) e do potencial Lennard-Jones (LJ), a energia eletrostática entre dois átomos é função da carga de cada um, assim cargas contrárias se atraem e iguais se repelem (Equação 1.19). (DARNELL, 2008)

$$U_{\text{Eletrostático}} = \sum_{\text{Pares-não-ligados}} \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} \quad (1.19)$$

Onde q_i e q_j são as cargas dos átomos i e j , r_{ij} a distância entre eles e ϵ uma constante.

O potencial de Lennard-Jones, também chamado de potencial 6-12, compõe-se de um termo de atração, elevado a sexta, e um termo de repulsão, elevado a 12, este último tem predominância a distâncias curtas (Equação 1.20). (BECK; DAGGETT, 2004)

$$U_{\text{LJ}} = \sum_{\text{Pares-não-ligados}} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (1.20)$$

Onde r_{ij}^{min} é a distância entre os átomos i e j a qual o potencial é mínimo, r_{ij} a distância entre os átomos e ϵ_{ij} o potencial mínimo.

1.5.3 NpT *ensemble*

Cada partícula a cada passo contém uma determinada energia, velocidade etc., entretanto estas variáveis quando ampliadas ao mundo macromolecular ou do laboratório são vistas como termos de pressão (p), temperatura (T) e volume (V), o objetivo da DM é mimetizar um sistema experimental, para tanto são aplicados sistemas de controles a fim de que essas variáveis de laboratório sejam mantidas nos parâmetros que o usuário desejar. NpT *ensemble* também conhecido como isobárico-isotérmico *ensemble*, descreve um sistema em contato com barostato, ou pistão, a uma pressão p e um termostato, ou banho térmico, a uma temperatura T , este sistema é habilitado a trocar calor com o termostato e também realizar trabalho com o barostato, por meio de controles, assim o sistema mantém constante T e p durante as simulações, neste *ensemble* o número de partículas é mantido fixo, contudo, essas não são impedidas de sair ou entrar do sistema que é controlado pelas condições periódicas de contorno, a energia total (E) e o volume (V) sofrem flutuações no equilíbrio térmico e como a maioria dos experimentos são realizados nessas condições, várias DM's utilizam o NpT *ensemble* (ULINE; CORTI, 2013).

A temperatura de um sistema de partículas é correlacionada com a média das velocidades dessas, assim as velocidades iniciais (t_0) podem ser fornecidas pela distribuição de Maxwell-Boltzmann na temperatura desejada, porém para os próximos passos é estratégico utilizar um fator de escala para multiplicar as velocidades das partículas a fim de manter constante a temperatura, o termostato de Langevin é um dos métodos aplicados para este controle, o mesmo depende de dois termos adicionais à equação de movimento, o de atrito e o de ruído (LEMONS, 1997) conforme a Equação 1.21.

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = -\frac{\partial U(r_i)}{\partial r_i} - m_i \gamma_i \frac{dr_i}{dt} + \eta_i(t) \quad (1.21)$$

Onde γ_i é o coeficiente de atrito (ps^{-1}) e $\eta_i(t)$ é o ruído, ou forças estocásticas, dependente da temperatura e do coeficiente de atrito.

O controle de pressão é realizado ajustando dinamicamente o tamanho da célula e reescalando todas as coordenadas dos átomos, um dos métodos de controle é o Nosé-Hoover (NOSÉ, 1984; HOOVER, 1985) modificado para se adaptar a equação de dinâmica de Langevin.

1.5.4 Os métodos de corte e *Particle Mesh Ewald*

O número de interações entre átomos não-ligados em um sistema contendo milhares de átomos pode causar *overhead*, para simplificar esta complexidade utiliza-se o método de corte (STEINBACH; BROOKS, 1994), que é realizado considerando que átomo de estudo está no centro de uma esfera de raio r_c (raio de corte), todos os átomos dentro deste volume serão considerados para os cálculos, valores de r_c geralmente são entre 8 a 12 Å (SCHLICK, 2010). O corte repentino do potencial de interações na fronteira da esfera não é desejado (KOEHL, 2006), já que influi na conservação de energia (SCHLICK, 2010), para evitar isso aplica-se

o método *Switch* que reduz suavemente a energia a zero em um intervalo predeterminado (STEINBACH; BROOKS, 1994), o método de corte é conveniente para as energias de van der Waals, em simulações com solvente explícito, esta energia torna-se insignificante além do r_c , em contrapartida para certos pares de átomos a energia eletrostática não é desprezível, para isso aplica-se o método *Particle Mesh Ewald*.

O método conhecido no inglês como *Particle Mesh Ewald*(PME) é uma variante do método da somatória de Ewald (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993) sendo um método eficaz para cálculo das interações eletrostáticas de longa distância, já foi demonstrada a importância de incluir estas interações em diferentes sistemas (SAGUI; DARDEN, 1999), em contrapartida o mesmo aumenta o tempo de cálculo.

O método PME consiste em dividir o sistema em grades tridimensionais. Dependendo da posição dos átomos do sistema, uma carga é atribuída a cada ponto da grade, então a energia eletrostática é calculada pela adição de: 1) somatória das interações de curta distância (determinada pelo raio de corte) que são explicitamente calculadas, 2) derivada numérica do potencial, o qual é obtido pela transformada rápida de Fourier (FFT) em função da distribuição das cargas da grade. A força exercida sobre cada átomo é calculada pela interpolação da energia sobre a grade. (POLLOCK; GLOSLI, 1996)

1.5.5 Condições periódicas de contorno

As simulações de DM são conduzidas geralmente em caixas retangulares, porém há partículas próximas as fronteiras da caixa e como no método NpT *ensemble* não há restrições de saída e entrada um método deve ser aplicado para gerenciar as interações e comportamentos dessas partículas.

A solução aplicada é colocar uma caixa no centro e cercá-la com uma sequência de sua imagem, assim se uma partícula atravessa uma determinada fronteira da caixa outra idêntica entra pela face oposta, a figura 9 exemplifica em 2D a técnica, assim o número de partículas permanece constante e as interações levarão em conta partículas que estão nas imagens vizinhas. (VERLI, 2014)

1.5.6 Constraints e Restraints

O sistemas moleculares apresentam movimentos com diferentes frequências, como por exemplo os movimentos vibracionais que geralmente têm maior frequência comparado aos movimentos translacionais e rotacionais, ocasionando a simulação de dinâmica molecular a utilizar um número maior de passos de integração, ou menor Δt , para contemplar esses movimentos, contudo aumentando o tempo cálculo. Congelando os movimentos de maior frequência pode se obter uma maior eficiência utilizando um Δt maior (NAMBA et al., 2008), reduzindo o custo computacional (FRENKEL; SMIT, 2001)

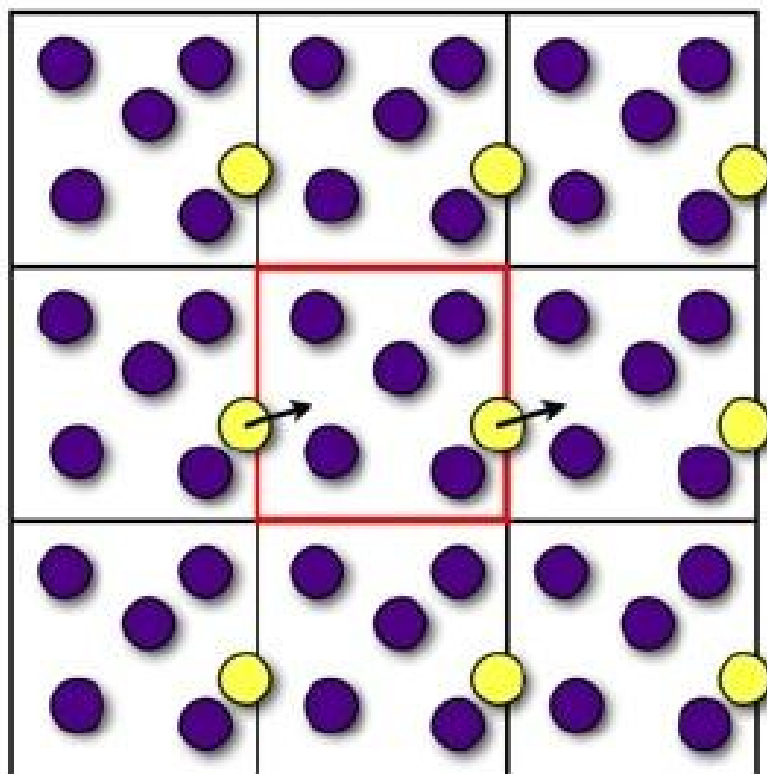
Figura 9 – Condições Periódicas de Contorno

Figura esquematizando o controle em 2D do número de moléculas em uma célula, demonstrando a saída de uma partícula pela direita e no mesmo instante entrada pela esquerda de uma idêntica devido a presença de imagens iguais ao redor.

Fonte: Oliveira (2013)

Van Gunsteren e Karplus (1982) mostraram que a fixação do comprimento de ligação não alterou significativamente as propriedades dinâmicas como a fixação dos ângulos fez, resultados similares foram obtidos por Toxvaerd (1987). Existem vários métodos de *constraints* como o SHAKE (RYCKAERT et al., 1977), RATTLE (ANDERSEN, 1983) e LINCS (HESS et al., 1997).

1.5.7 Dinâmica molecular aplicada ao planejamento de fármacos

A visão estática de uma biomolécula como a provida por cristalografia de raio-X é insuficiente para a compreensão de uma gama de atividades biológicas. No campo da dinâmica molecular os sistemas de simulações trazem informações importantes com relação a geometria molecular, energias moleculares, média das flutuações atômicas, flutuações locais (como formação/quebra de pontes de hidrogênio, padrões de interações de águas/solutos/íons), difusão, sítio de ligação entre o ligante e a proteína e energia livre (NAMBA et al., 2008; SCHLICK, 2010; DURRANT; MCCAMMON, 2011)

A DM também é conhecida por produzir melhores resultados de energias médias, porém

tem no custo computacional o seu maior impeditivo. O desenvolvimento tecnológico vem reduzindo esta barreira (ADCOCK; MCCAMMON, 2006). Apesar disto, protocolos de prospecção de fármacos podem ser adaptados afim de incluir a DM em conjunto com o *docking molecular/virtual screening* obtendo melhor acuracidade dos resultados (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006).

Protocolos diversos foram estabelecidos utilizando a DM em conjunto com outros métodos. Namba e colaboradores (2008) descrevem e citam vários artigos que utilizaram a DM, pura ou em conjunto, com resultados promissores.

Como exemplo, Carlsson, Boukharta e Åqvist (2008) utilizaram a DM em conjunto com *docking molecular* e *linear interaction energy* (LIE - Equação 1.22). Foram selecionados 43 inibidores não-nucleosídeos de HIV-1 transcriptase reversa. O *docking molecular* gerou o modo de ligação inicial destes inibidores na estrutura cristalográfica para a DM. As energias de van der Waals (U_{l-s}^{vdW}) e eletrostática (U_{l-s}^{ele}) foram obtidas da DM. Análises mostraram que predição da energia de ligação (ΔG_{LIG}^{LIE}) de 39 dos 43 inibidores apresentaram boa correlação com o experimental (NAMBA et al., 2008).

$$\Delta G_{LIG}^{LIE} = \alpha \Delta U_{l-s}^{vdW} + \beta \Delta U_{l-s}^{ele} + \gamma \quad (1.22)$$

O mecanismo de reconhecimento molecular receptor-ligante é um dos aspectos centrais para o sucesso na descoberta e planejamento de novos fármacos na área de desenho racional de fármacos baseado em estrutura (DE MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2007). Reconhecimento de um ligante no sítio do receptor pode ser encarado como um resultado dos movimentos de orientação e translacional do ligante dentro do campo potencial elétrico da superfície do receptor. Uma interação específica é encontrado quando a orientação do ligante encaixa com as propriedades físicas e químicas complementares ao do receptor (AZEVEDO; DIAS, 2008).

A investigação de ligação em um complexo proteína-ligante inicia-se pela análise do desvio médio quadrático das posições dos átomos (RMSD) (DE MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2007). O cálculo do RMSD é realizado comparando as coordenadas dos átomos, geralmente da cadeia principal ou carbonos alfa, durante a trajetória com relação a coordenada inicial conforme a Equação 1.23

$$RMSD = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i(t) - r_i(0))^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1.23)$$

Sendo $r_i(t)$ e $r_i(0)$ as coordenadas i-ésimo átomo no tempo t e 0 respectivamente e N o número de átomos em estudo.

Outro indicador é a flutuação média quadrática (RMSF), o mesmo leva em consideração

a flutuação de cada resíduo aminoácido, representado pelo carbono alfa, em relação a sua posição média conforme a Equação 1.24

$$RMSF = \left[\frac{1}{\mathfrak{S}} \sum_{t=1}^{\mathfrak{S}} (r_i(t) - \bar{r}_i)^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1.24)$$

Onde $r_i(t)$ são as coordenadas i-ésimo átomo no passo de tempo t , \bar{r}_i sua posição média e \mathfrak{S} é o número de passos de tempos coletados.

Também de interesse é o raio de giro (Rg), que informa o grau de compactação da estrutura ao redor do centro de massa da proteína conforme a Equação 1.25

$$Rg = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \|r_i - r_{cm}\|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1.25)$$

Sendo que r_i é a coordenada do i-ésimo átomo e r_{cm} coordenada do centro de massa da proteína e N o número de átomos em estudo. (MARTÍNEZ; BORIN; SKAF, 2007)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os comportamentos estruturais da enzima *Pf*HGXPRT, avaliando sua dinâmica frente ao seus ligantes naturais em solução, utilizando o método de simulação de dinâmica molecular, e validar modelo computacional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

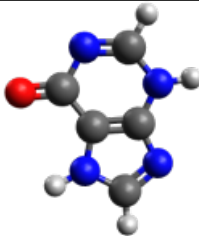
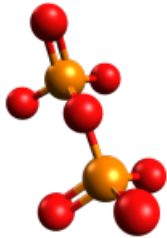

- Realizar as simulações por DM da enzima *Pf*HGXPRT nas formas: 1) livre, 2) em complexo com a hipoxantina (HPA), 3) em complexo com o íon pirofosfato (PP_i) e 4) em complexo com a HPA, íon PP_i e íon magnésio (Mg);
- Caracterizar as alterações nas conformações da referida enzima quando complexada com os ligantes em comparação a forma livre em solução sob influência de temperatura e pressão;
- Identificar aspectos dinâmicos estruturais, determinantes na interação específica proteína-ligante para a *Pf*HGXPRT; e
- Realizar a dinâmica molecular de um candidato a potencial fármaco para validação do modelo computacional.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

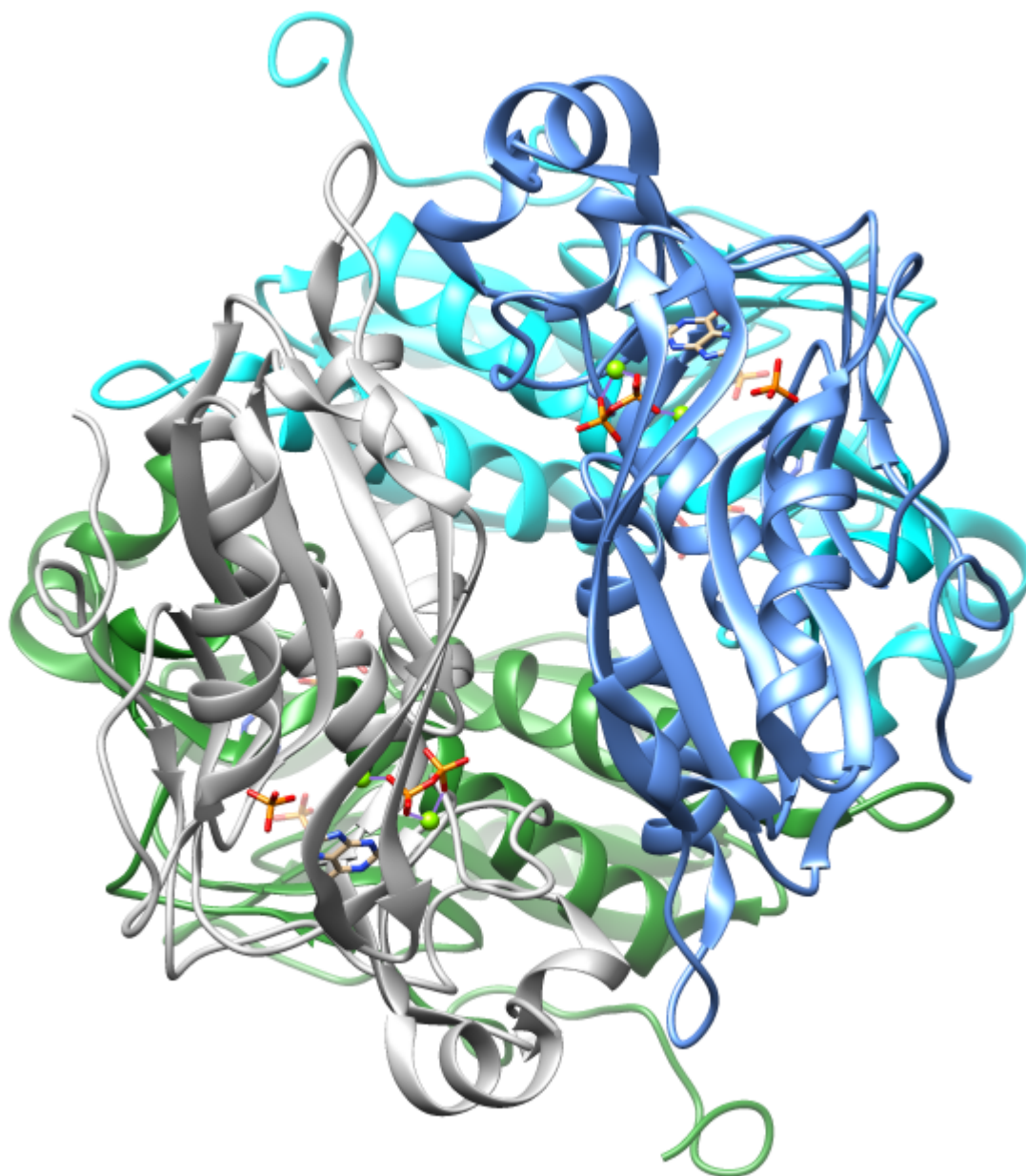
3.1 PROTOCOLO DE DINÂMICA MOLECULAR

A estrutura cristalográfica da *PfHGXPRT* foi obtida do *Protein Data Bank* (BERMAN et al., 2000) com o identificador 3OZF (HAZLETON et al., 2012) de resolução 1,94 Å. A estrutura é um tetrâmero (Figura 10) contendo os ligantes hipoxantina (HPA), íon fosfato (PO₄), íon pirofosfato (PPi) e o cofator magnésio (Mg) em cada monômero. A proteína inteira foi utilizada para as simulações devido a mesma ser biologicamente funcional como tetrâmero. Este trabalho é o primeiro que realizou a simulação de DM para a *PfHGXPRT*.

Tabela 1 – Ligantes utilizados na DM

Ligantes	Fórmula Molecular	Confôrmero	Carga Formal
Hipoxantina	C ₅ H ₄ N ₄ O		0
Pirofosfato	P ₂ O ₇		-4
Magnésio	Mg		+2

As simulações de DM foram realizadas com o programa *Nanoscale Molecular Dynamics* (NAMD) 2.9 (PHILLIPS et al., 2005) utilizando o campo de força CHARMM22 (MACKERELL et al., 1998). Os ligantes não parametrizados foram utilizados como entrada na ferramenta SwissParam (ZOETE et al., 2011) para geração dos arquivos de parâmetros e topologia. Os programas *General Atomic and Molecular Electronic Structure System* (GAMESS) (SCHMIDT et al., 1993) e Gabedit (ALLOUCHE, 2011) foram utilizados em combinação com o método *Restrained Electrostatic Potential* (RESP) (BAYLY et al., 1993) para obter as cargas parciais dos átomos dos ligantes. Os parâmetros do GAMESS aplicados foram o RHF 6-31G, com correlação eletrônica DFT utilizando o método B3LYP (APÊNDICE B). O arquivo de entrada para o

Figura 10 – Representação em 3D da estrutura depositada 3OZF

Hipoxantina-Guanina-Xantina Fosforibosil Transferase de *P. falciparum* em complexo com os ligantes hipoxantina, fosfato, pirofosfato representados em forma de bastão e o cofator magnésio em forma de esfera, os monômeros A, B, C e D estão representados pelas cores ciano, verde cinza e azul respectivamente.

programa RESP 2.2 (DUPRADEAU et al., 2010) foi gerado pelo script makeresp (ANEXO A), que foi criado por Dmitri G. Fedorov, utilizando os arquivos de saída do GAMESS.

Foram realizadas simulações de 4 sistemas: o primeiro sistema contendo a apoenzima *Pf*HGXPT, o segundo em complexo com a hipoxantina, o terceiro em complexo com pirofosfato e o quarto em complexo com hipoxantina, pirofosfato e íon magnésio.

As configurações iniciais dos complexos foram preparados utilizando o programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). Primeiramente foram

separados os monômeros, seguido da unificação destes e geração do arquivo de estrutura da proteína (psf) e de coordenadas (pdb), utilizando o arquivo de topologia *top_all27_prot_lipid.inp*, arquivos de topologia dos ligantes (quando aplicável ao sistema de simulação) e o script *prot.pgn* (APÊNDICE C) que automatiza o processo.

O arquivo de saída foram solvatados utilizando o módulo *solvate* do VMD, em uma caixa com o modelo de água TIP3P (JORGENSEN et al., 1983), as caixas contêm aproximadamente 20345 moléculas de água, tamanho inicial de 9 nm x 9,5 nm x 9,9 nm e 1 nm de distância mínima da superfície da proteína ao final da caixa em qualquer direção.

O procedimento de preparação foi finalizado com o balanceamento e neutralização das cargas com íons cloro e sódio utilizando o módulo *autoionize* do VMD.

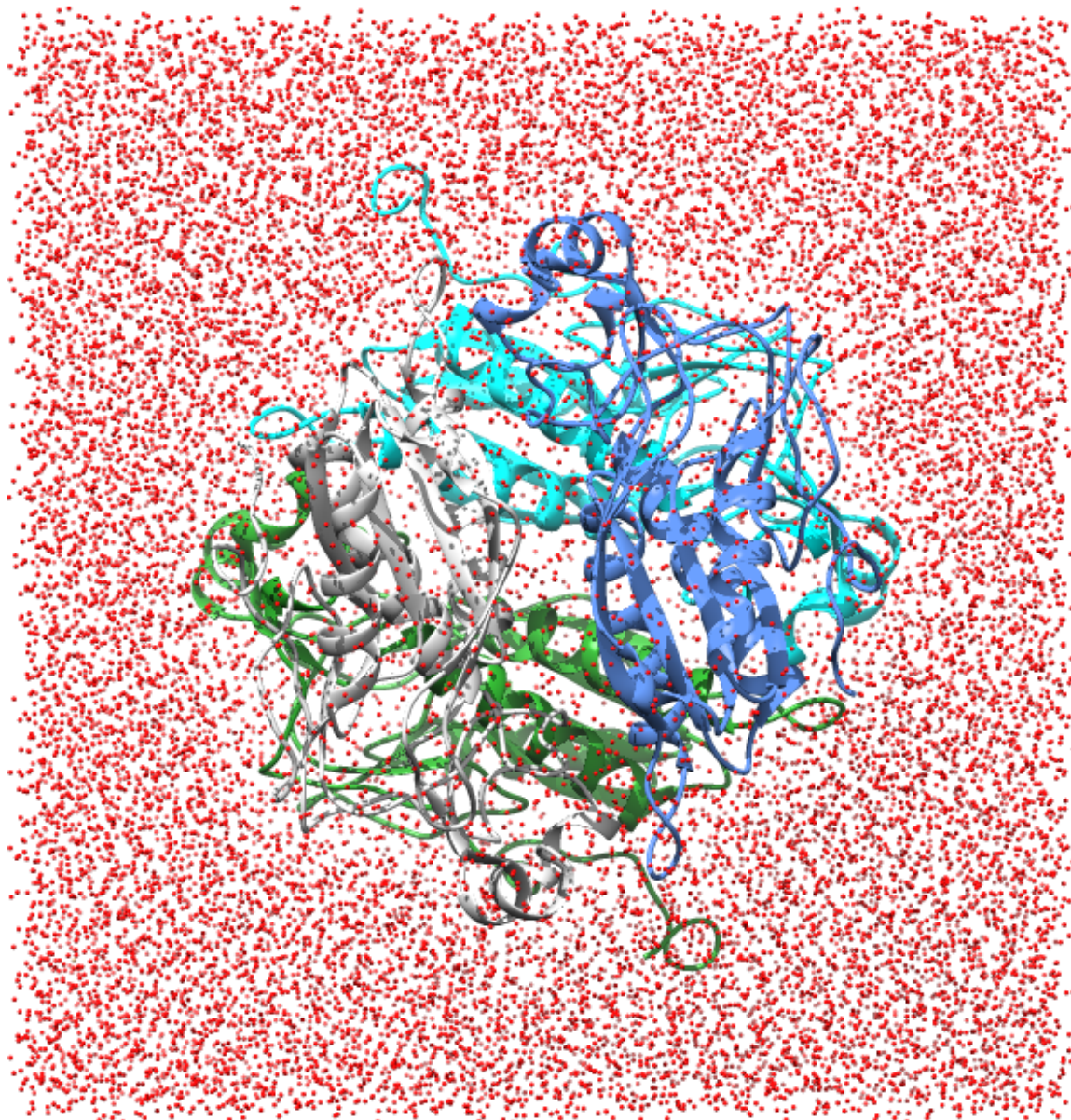
Os arquivos preparados foram submetidos a comandos (APÊNDICE D) do VMD para: 1) geração de arquivos contendo informações sobre a fixação dos átomos da cadeia principal e de constrangimentos dos carbonos alfa, 2) parâmetros para as simulações de DM como *cellBasisVector*, *cellOrigin* e *PMEGridSize* que neste trabalho são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros iniciais da DM calculados

	X (Å)	Y (Å)	Z (Å)
cellBasisVector1	90,0	0,0	0,0
cellBasisVector2	0,0	95,0	0,0
cellBasisVector3	0,0	0,0	99,0
cellOrigin	0,2	-10,7	41,7
PMEGridSize	96	96	108

As minimizações de energia foram realizadas em duas etapas, cada uma contendo 500 passos do método *old-style* do NAMD e 5.000 passos com o método de gradiente conjugado, a primeira etapa todos os átomos da cadeia principal estão fixados e na segunda somente os carbonos alfa com constrangimentos. A termalização foi realizada em incrementos na temperatura de 25K a cada 1.000 passos, mantendo a restrições nos carbonos alfa, até 300K somando um total de 12.000 passos e mantido na temperatura final por mais 125.000 passos, no estágio final os constrangimentos foram removidos e o sistema foi equilibrado em um total de 750.000 passos, sendo que o parâmetro *langevinDamping* foi alterado de 5 para 1 ps⁻¹ nos últimos 500.000 passos. A fase de produção foi dividida em blocos de 2,5 ns somando um total de 30 ns e computadas utilizando Langevin NpT *ensemble*.

Todas as simulações foram realizadas na temperatura de 300 K e 1 atm de pressão. Nosé-Hoover Langevin foi utilizado para o controle de pressão do pistão com passo de integração de 1,0 fs nas equações de movimento. As interações eletrostáticas entre átomos não ligantes foram estimadas via o método *particle-mesh Ewald* (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993), o *cutoff* de 1,2 nm foi estabelecido para truncar as interações de Lennard-Jones, sendo habilitado o método *Switch* entre 1,0 a 1,2 nm. O algoritmo de SHAKE foi usado nos constrangimentos

Figura 11 – Estrutura 3D da *Pf*HGXPRT preparada para a DM

Apoenzima após passar pelos protocolo de preparação da estrutura, os íons provenientes do balanceamento e neutralização e as moléculas de água provenientes da solvatação estão representados por esferas, os monômeros A, B, C e D estão representados pelas cores ciano, verde cinza e azul respectivamente.

das moléculas de água. As simulações e análises dos resultados foram realizadas em um DELL Server PowerEdge 2900 Xeon DuoQuadCore – 3GHz.

3.2 PROTOCOLO DE COLETA E GERAÇÃO DE DADOS

As dinâmicas finalizadas, passaram pelo processo de concatenação dos blocos de arquivos utilizando a extensão catcdcd 4.0 (GULLINGSRUD, 2009) do VMD. As coletas de dados foram realizadas pelo *script* novoscript.tcl (APÊNDICE G) a qual automatiza e gera arquivos com os dados de RMSD global e dos monômeros, RMSF e Rg. O pacote Calc pertencente ao programa

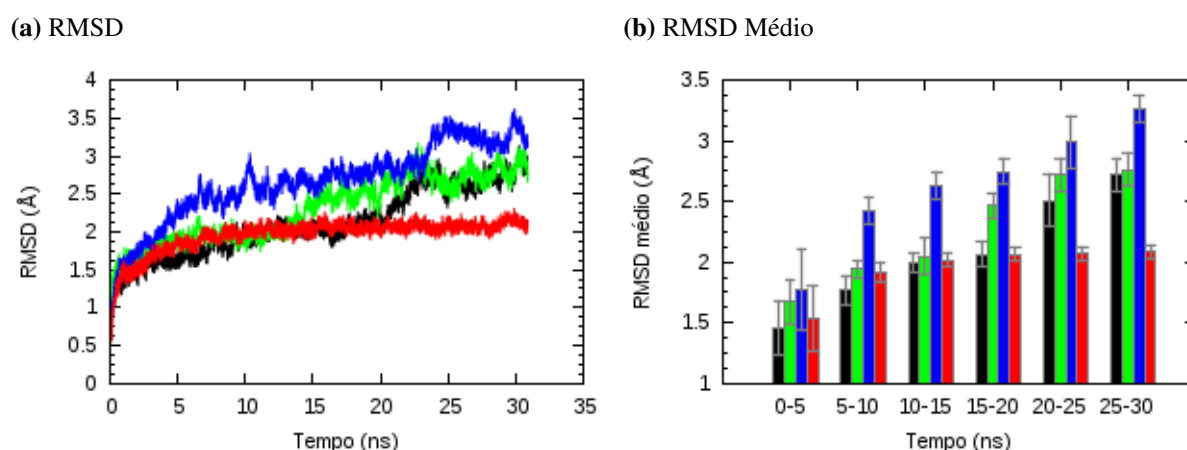
Libreoffice (<<http://pt-br.libreoffice.org>>) foi utilizado para obtenção das médias e desvio padrão, a cada 5 ns, dos dados de RMSD e Rg. O programa Gnuplot (WILLIAMS; KELLEY, 2013) foi aplicado para geração dos gráficos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTABILIDADE E FLEXIBILIDADE

O principal monitoramento das mudanças conformacionais na estrutura da *Pf*HGXPRT provocadas pela presença dos ligantes foi verificada através do cálculo de RMSD da cadeia principal da *Pf*HGXPRT apoenzima (sistema 1) com os complexos *Pf*HGXPRT:HPA (sistema 2), *Pf*HGXPRT:PP_i (sistema 3) e *Pf*HGXPRT:HPA:PP_i:Mg (sistema 4). A comparação é realizada desde a configuração inicial até os 30 ns, sendo calculado o RMSD global (Figura 12a) e o RMSD de cada monômero (APÊNDICE H). No caso do RMSD global foi realizado o cálculo adicional das médias a cada 5 ns (Figura 12b).

Figura 12 – RMSD da *Pf*HGXPRT



Figuras demonstrando o RMSD dos sistemas: Sistema 1 em preto; Sistema 2 em verde; Sistema 3 em azul; Sistema 4 em vermelho. Os valores do RMSD médio dos sistemas a cada 5 ns e seu desvio padrão é apresentando a seguir: Sistema 1 ($1,45 \pm 0,22$; $1,77 \pm 0,12$; $2,00 \pm 0,08$; $2,07 \pm 0,10$; $2,51 \pm 0,21$; $2,72 \pm 0,13$); Sistema 2 ($1,68 \pm 0,18$; $1,94 \pm 0,07$; $2,05 \pm 0,15$; $2,47 \pm 0,10$; $2,71 \pm 0,13$; $2,76 \pm 0,13$); Sistema 3 ($1,77 \pm 0,33$; $2,42 \pm 0,11$; $2,63 \pm 0,12$; $2,75 \pm 0,10$; $2,99 \pm 0,21$; $3,26 \pm 0,11$); Sistema 4 ($1,53 \pm 0,27$; $1,92 \pm 0,07$; $2,02 \pm 0,05$; $2,06 \pm 0,05$; $2,07 \pm 0,05$; $2,09 \pm 0,06$).

É evidente que o complexo *Pf*HGXPRT:HPA:PP_i:Mg a partir de 15 ns de simulação este sistema começa a tornar-se o único estável, quando comparado a forma livre e os outros complexos, sugerindo que o conjunto de ligantes do sistema 4 proporciona estabilidade a proteína.

Observa-se nas figuras 12a e 12b, um rápido aumento nos valores de RMSD em todos os sistemas nos momentos iniciais, porém após 5 ns de simulação os sistemas 1, 2 e 4 atingiram um platô, com valores de RMSD oscilando entre 1,5 a 2 Å. Os sistemas 1 e 2, ao aproximarem de 15 e 20 ns de simulação respectivamente, admitiram mudanças conformacionais em parte de seus monômeros, como observado no monômero B do sistema 2 em torno de 15 ns (APÊNDICE H - figura b), e nos monômeros C e D do sistema 1 a partir de 20 ns (APÊNDICE H - figura c e d). O sistema 4 manteve o RMSD estável o restante da simulação, sugerindo que os 30 ns de

simulação são suficientes para estabilizar a estrutura e obter informações sobre a estabilidade do sistemas. Os ligantes presentes sistemas 2 e 3 não proporcionam estabilidade, ou seja HPA e PP_i sozinhos não são capazes de estabilizar a proteína e consequentemente esses ligantes não seriam conduzidos a um estado de transição estável que proporcionaria uma catálise. Apesar da diferença de RMSD do sistema 4 em relação aos outros sistemas, as estruturas secundária destes foram mantidas, sendo que essas diferenças no desvio são consequências da maior instabilidade registradas nos sistemas incompletos comparados ao sistema 4.

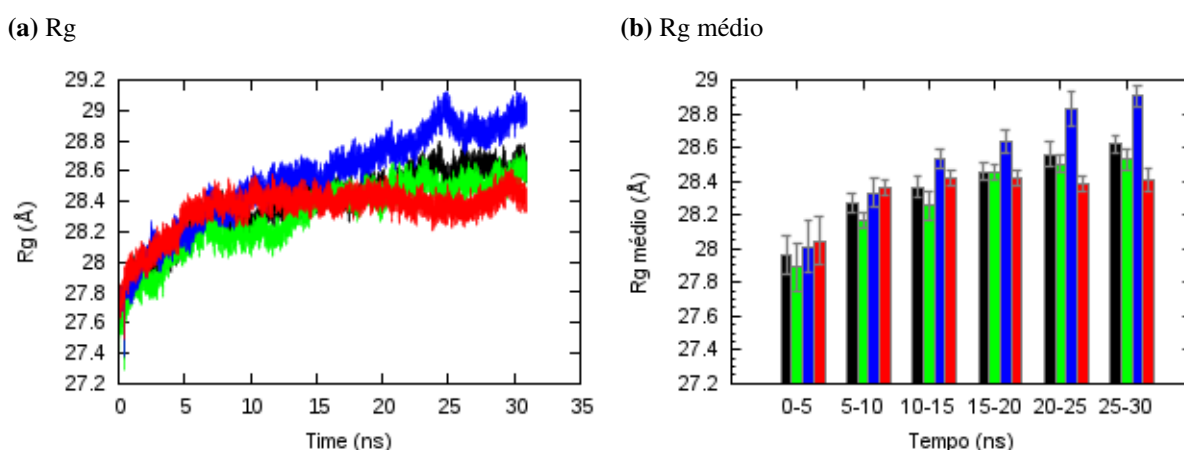
O raio de giro (Rg) da proteína toda, com exceção dos hidrogênios, também foi avaliado, esta análise traz informações sobre a estabilidade e compactação do sistema em estudo.

Similarmente ao RMSD, o Rg também mostra claramente que em torno de 10 ns de simulação o sistema 4 é o mais estável quando comparado aos outros sistemas. O comportamento de um platô desta análise após 5 ns demonstra que o mesmo sistema mantém uma compactação relativamente constante, induzindo que o sistema 4 é bastante estável em solução.

Nas figuras 13a e 13b, observa-se um aumento do Rg nos instantes iniciais, entretanto quando simulação está entre 5 a 10 ns todos os sistemas atingem um platô, com valores variando de 28 a 28,4 Å, sendo que os sistemas 1 e 2 obtiveram inicialmente valores mais baixos de Rg. Ao atingir aproximadamente 15 ns os átomos dos sistemas 1, 2 e 3 começaram a distanciar de seu centro de massa, sendo assim somente o sistema 4 manteve a estabilidade e compactação constante.

A flexibilidade dos sistemas foram avaliados pelo RMSF das trajetórias dos carbonos

Figura 13 – Raio de giro da PfHGXPRT



Figuras demonstrando o Rg dos sistemas: Sistema 1 em preto; Sistema 2 em verde; Sistema 3 em azul; Sistema 4 em vermelho. Os valores do Rg médio dos sistemas a cada 5 ns e seu desvio padrão é apresentando a seguir: Sistema 1 (27,96±0,11; 28,27±0,05; 28,37±0,07; 28,46±0,05; 28,56±0,08; 28,63±0,05); Sistema 2 (27,89±0,15; 28,17±0,05; 28,25±0,08; 28,45±0,05; 28,50±0,06; 28,53±0,06); Sistema 3 (28,01±0,15; 28,33±0,09; 28,53±0,05; 28,64±0,07; 28,83±0,10; 28,90±0,06); Sistema 4 (28,05±0,14; 28,37±0,05; 28,42±0,04; 28,42±0,04; 28,39±0,05; 28,41±0,06).

alfa do monômero A, que refletem na flexibilidade de cada átomo nos resíduos (Figura 14).

É perceptível que o sistema 4 tem variações menores de RMSF quando comparado ao sistema 1, notavelmente nas regiões do sítio ativo, onde há resíduos com interações frequentes com os ligantes, como exemplo: LYS77, ASP148, ILE146, LYS176, PHE197, VAL198, LEU203, ASP204 e ARG210.

Observa-se na figura 14 algumas regiões que possuem resíduos a qual acumulam altas variações de RMSF, como a região entre 115 a 125. Para compreendê-las foram coletados dados adicionais como o RMSD dos ligantes e as estruturas 3D no tempo. A região em específico é formado por um laço conectando uma folha beta antiparalela, em vermelho na figura 15, que possui resíduos com interações hidrofóbicas com a HPA.

Figura 15 – Regiões com flutuações espaciais destacadas

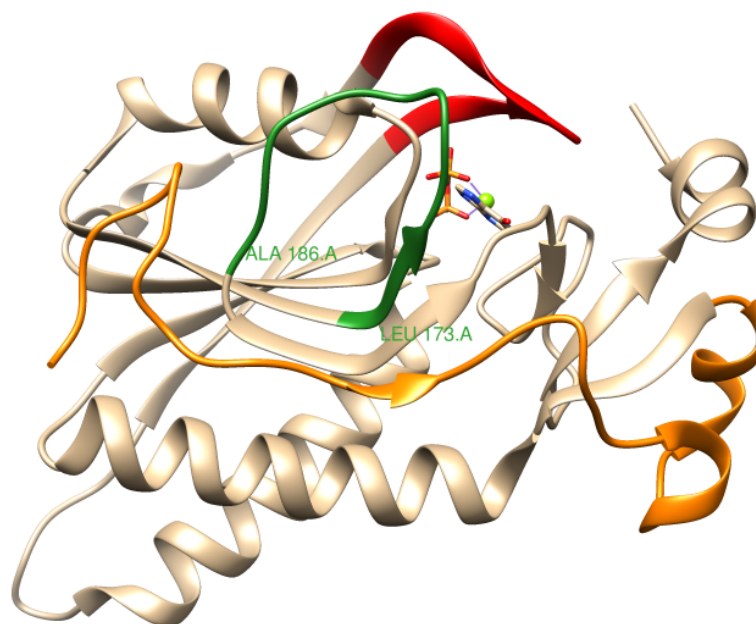


Figura destacando algumas regiões que apresentam flutuações altas em alguns sistemas. A primeira região, em laranja, os sistemas 2,3 e 4 possuem resíduos nesta região com alta flutuação. A segunda região, em vermelho, apresentam resíduos com alta flutuação nos sistemas 2 e 3. A terceira região, em verde, possui resíduos com alta flexibilidade somente no sistema 1.

No sistema 3, o pirofosfato não se estabiliza no sítio ativo (Figura 16a), porém suas interações de pontes de hidrogênio com os resíduos ARG112 e LYS114 continuam, provocando modificações conformacionais na região entre os resíduos 115 a 125. Esta flutuação é explicada devido a necessidade de adaptação com a nova posição do PP_i (Figura 17a). Esta modificação ocasiona a exposição de resíduos catalíticos ao exterior (Figura 18), e aparentemente este mecanismo não é totalmente indesejável pois permitiria a entrada dos reagentes e saída dos

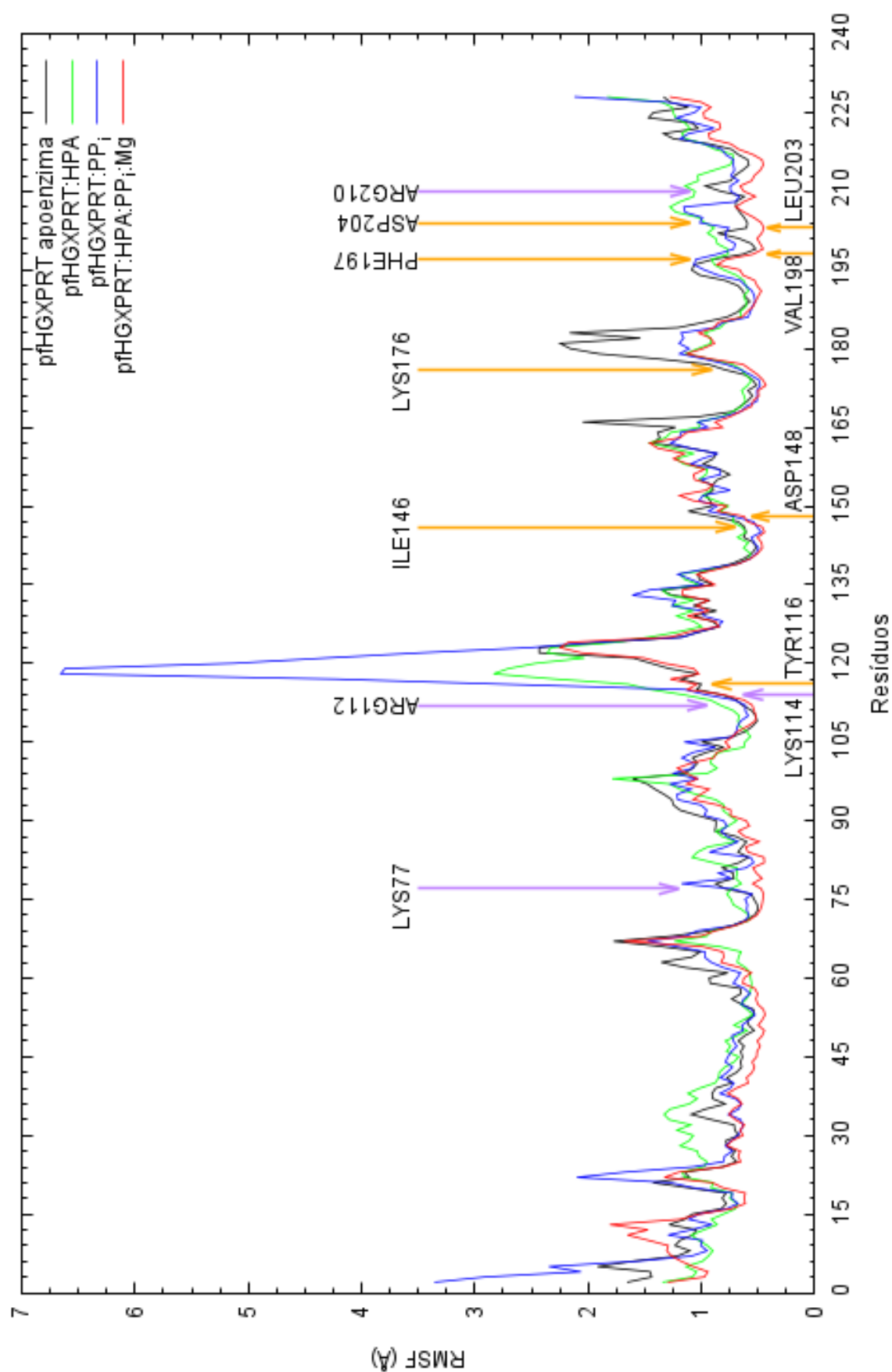
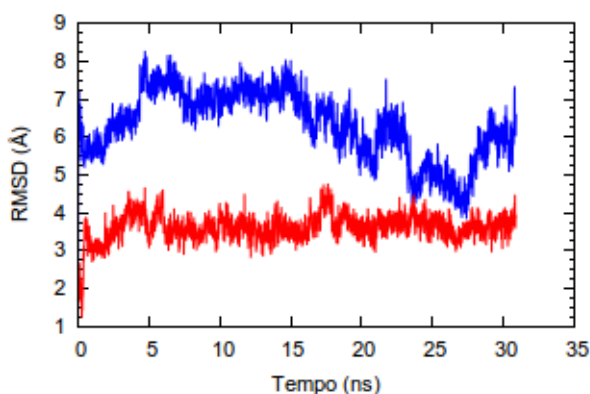
Figura 14 – RMSF da cadeia A da *Pf*HGXPERT

Figura demonstrando as flutuações espaciais dos carbonos alfa no monômero A. As flechas laranjas e roxas mostram resíduos com interações com a HPA e PP_i respectivamente no sistema 4.

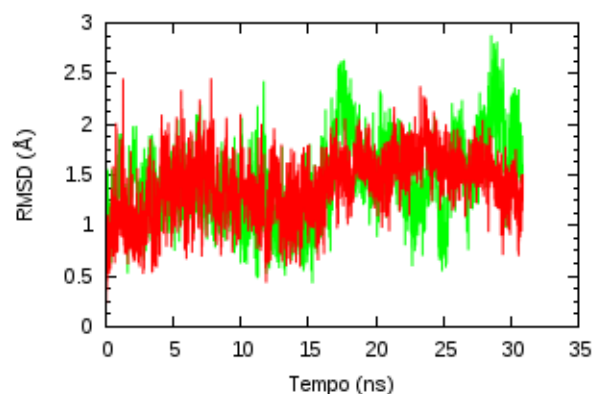
produtos que são moléculas grandes, ou seja pode ser um mecanismo natural, já que o pirofosfato é um produto da reação e poderia induzir a essas movimentações a fim de liberar os produtos e dar continuidade a reação enzimática, porém para melhor evidência, é interessante a simulação com os produtos IMP e os íons PP_i e Mg, e observar modificações semelhantes ao sistema 3 nesta região para corroborar esta hipótese.

Figura 16 – RMSD dos ligantes

(a) RMSD do PP_i



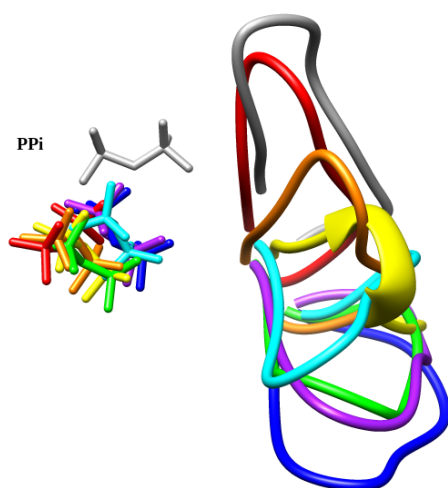
(b) RMSD da HPA



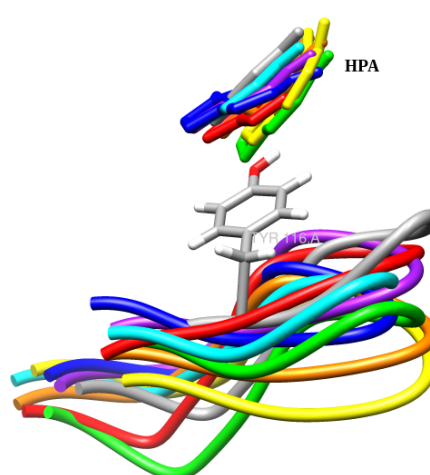
Figuras demonstrando o RMSD dos ligantes em cada sistema, em verde o sistema *Pf*HGXPRT:HPA (sistema 2), em azul do sistema *Pf*HGXPRT: PP_i (sistema 3), em vermelho do sistema *Pf*HGXPRT:HPA: PP_i :Mg (sistema 4)

Figura 17 – Superposição de estruturas 3D na região entre os resíduos 115 a 125

(a) Superposição do sistema 3



(b) Superposição do sistema 2



Superposição das estruturas 3D na região entre os resíduos 115 a 125 do monômero A da *Pf*HGXPRT no tempo. A cor cinza representa a estrutura no tempo 0 ns, vermelho em 4 ns, laranja 8 ns, amarelo em 12 ns, verde em 16 ns, ciano em 20 ns, azul em 24 ns e roxo em 28 ns

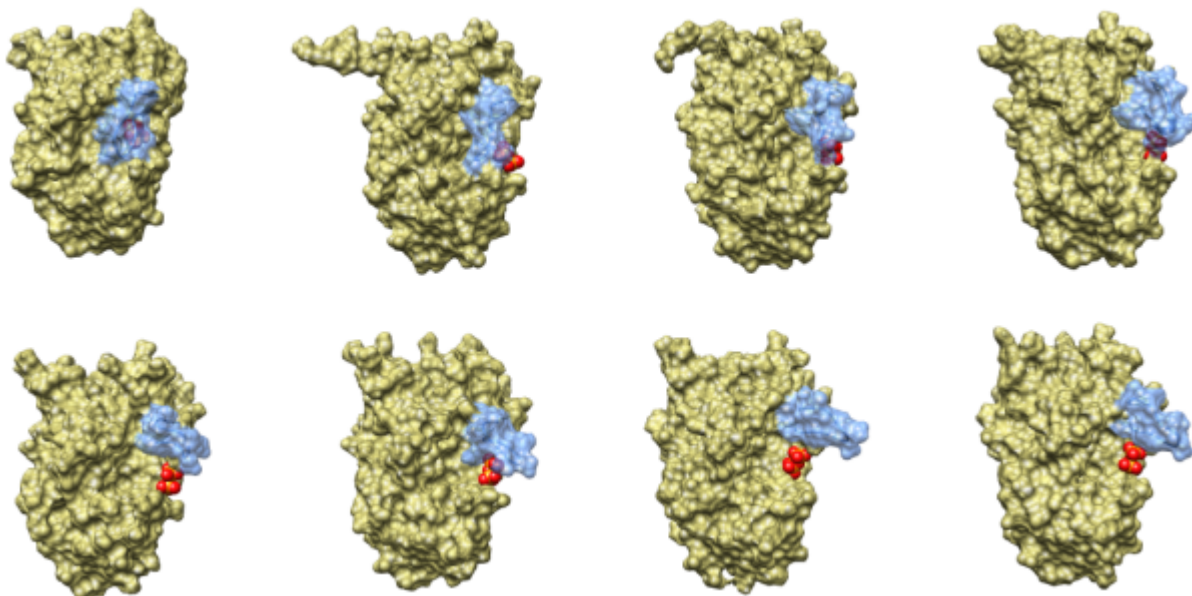
Figura 18 – Conformações do monômero A da *Pf*HGXPRT no sistema 3

Figura demonstrando as conformações do monômero A da *Pf*HGXPRTs no sistema 3. Em azul claro os resíduos 115 a 125, o pirofosfato está representado em forma de esferas. As figuras representam a proteína nos seguintes tempos de simulação: 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 ns organizados da esquerda para a direita de cima para baixo.

De maneira similar o sistema 2 possui alta variação na região 115 a 120 quando comparado ao sistemas 1 e 4, neste sistema o íon HPA é relativamente estável em seu sítio ativo (Figura 16b), entretanto o que ocorre é uma repulsão ocasionado pela HPA em seu contato hidrofóbico TYR116 (Figura 17b). Esta situação não é observada no sistema 4, pois existem resíduos anteriores a esta região (ARG112 e LYS114) que têm interações estáveis com o PP_i forçando a TYR116 a ter uma flutuação baixa e consequentemente auxiliando a HPA do sistema 4 a ter uma conformação mais estável que a HPA do sistema 2 (Figura 16b).

Outras regiões como dos resíduos 2 a 39, em laranja na figura 15, e 173 a 186, em verde na figura 15, não possuem resíduos que fazem parte do sítio catalítico dos ligantes estudados. A primeira região está na extremidade do monômero A com poucas interações intermoleculares, então suscetível a flutuações espaciais. A segunda região tem uma flutuação alta somente com a apoenzima. A forma do gráfico de RMSF dessa região é idêntica ao do sistema 2 e 4 porém com flutuações maiores, indicando um efeito indireto dos ligantes na estabilidade desses resíduos.

Estudos experimentais descrevem que o comportamento da *Pf*HGXPRT difere das enzimas equivalentes de outros organismos. Como a instabilidade da proteína, a qual dificulta a obtenção da estrutura cristalizada (QUEEN; VANDER JAGT; REYES, 1988; KEOUGH et al., 1999; MBEWE; CHIBALE; MCINTOSH, 2007), situação tal, que atualmente existem somente 3 estruturas depositadas no PDB, 1CJB (SHI et al., 1999), 3OZF (HAZLETON et al., 2012) e 3OZG (HAZLETON et al., 2012). Outro fator é que a enzima recombinante tem atividade enzimática insignificante após a purificação (RAMAN et al., 2005).

Vários artigos mostram avanços nos métodos de ativação da *Pf*HGXPRT recombinante, que se baseiam na incubação da proteína enovelada, porém fracamente inativa, com seus ligantes naturais, como o conjunto HPA e PRPP (KEOUGH et al., 1999). Uma das teorias levantadas para explicar a fraca atividade desta enzima é que, esta sem os ligantes específicos, teria uma conformação diferente da sua forma ativa (MBEWE; CHIBALE; MCINTOSH, 2007). Raman e colaboradores (2005) descrevem que a *Pf*HGXPRT aparenta um comportamento de enzima metaestável, ou seja com vários estados estáveis, mas diferente de outras enzimas metaestáveis, os mesmos descrevem que as conformações são facilmente intercambiáveis, devido a baixa barreira energética ou seja dependendo somente da colocação ou retirada de ligantes. Neste trabalho partimos de uma estrutura (3OZF) com conformação inicial que foi induzida pelos ligantes HPA, PP_i , PO_4 e Mg, ao removê-los (sistema 1), observamos mudanças conformacionais sem perda da estrutura secundária, porém também sem atingir um novo estado estável, tornando esta dissertação não conclusiva sobre a metaestabilidade, entretanto as modificações conformacionais observadas podem ser o prenúncio deste comportamento, então a extensão e ampliação deste trabalho podem auxiliar a corroborar ou refutar esta hipótese.

4.2 INTERAÇÕES DA *Pf*HGXPRT COM A HPA E O ÍON PP_i

A especificidade e afinidade entre a enzima e seu inibidor depende direcionalmente das ligações de hidrogênios e interações iônicas, bem como da complementaridade da forma das superfícies de ambas partes.

Análises das ligações de hidrogênio entre a *Pf*HGXPRT e HPA revelam 3 pontes de hidrogênio intermoleculares. Os resíduos envolvidos na interação HPA-*Pf*HGXPRT são mostrados nas figuras 19a realizados por meio do LIGPLOT (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) e resumidos de acordo com a duração da DM na tabela 3.

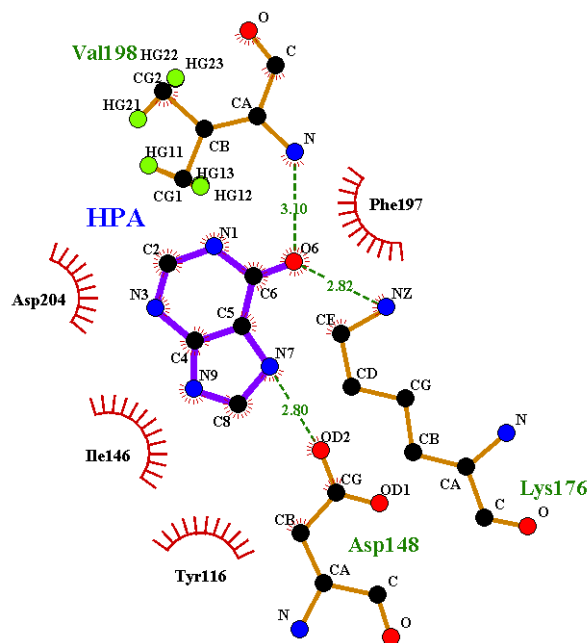
Durante os 30 ns, os resíduos aos quais fazem pontes de hidrogênio e contatos hidrofóbicos, TYR116, ILE146, APS148, LYS176, PHE197, VAL198 e ASP204, se mantiveram presentes em todas as amostras coletadas, a LEU203 apresenta como contato hidrofóbico em 5 das 7 amostras.

Em relação flexibilidade destes resíduos em interações com HPA, com exceção a TYR116 todos apresentam melhor estabilidade conformacional no sistema 4 (Figura 14), porém como demonstrado na seção anterior esse resíduo tem importância idêntica aos outros contatos hidrofóbicos pois auxilia na estabilização da HPA em seu sítio ativo.

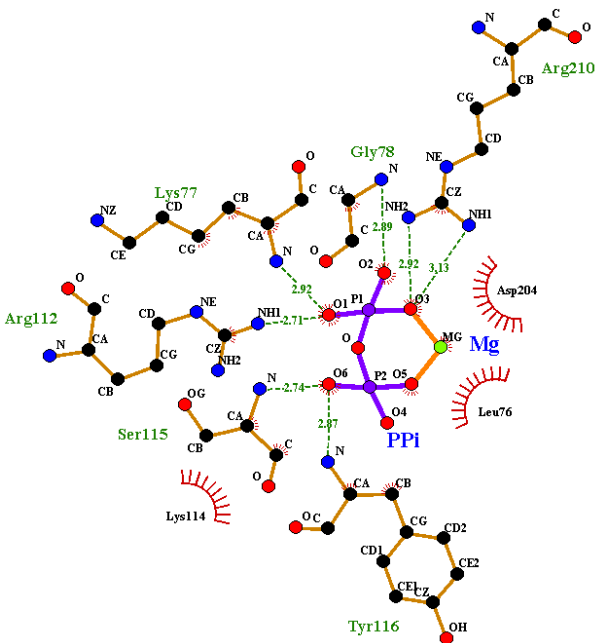
Análises das ligações de hidrogênio entre a *Pf*HGXPRT e íon PP_i revelam 7 pontes de hidrogênio intermoleculares. Os resíduos envolvidos na interação PP_i -*Pf*HGXPRT são mostrados nas figuras 19b e resumidos de acordo com a duração da DM na tabela 4.

Figura 19 – Interações entre os ligantes e a *Pf*HGXPRT

(a) HPA - HGXPRT



(b) PP_i - HGXPRT



Figuras demonstrando as interações da HPA (a) e PP_i (b) com a *Pf*HGXPRT no instante 0 ns. Em tracejado verde são as pontes de hidrogênio, a linha laranja representa as ligações iônicas e o semicírculo vermelho interações hidrofóbicas.

Tabela 3 – Interações entre o monômero A do sistema 4 e a HPA

Tempo (ns)	Resíduos	Átomos (HGXPRT → HPA)	Dist. Å	C. Hidrofóbicos
0	VAL198	N → O6	3,10	TYR116
	LYS176	NZ → O6	2,82	ILE146
	ASP148	OD2 → N7	2,80	PHE197
				ASP204
5	LYS176	NZ → O	2,60	TYR116
	ASP148	OD1 → N7	2,59	ILE146
				PHE197
				VAL198
				LEU203
				ASP204
10	LYS176	NZ → O	2,68	TYR116
	ASP148	OD1 → N7	2,55	ILE146
				PHE197
				VAL198
				LEU203
				ASP204

Continua

Continuação				
Tempo (ns)	Resíduos	Átomos (HGXPRT → HPA)	Dist. Å	C. Hidrofóbicos
15	LYS176	NZ → O	2,66	TYR116
	ASP148	OD2 → N7	2,54	ILE146
				PHE197
				VAL198
				ASP204
20	LYS176	NZ → O	2,75	TYR116
	ASP148	OD2 → N7	2,57	ILE146
				PHE197
				VAL198
				LEU203
25	LYS176	NZ → O	2,79	TYR116
	ASP148	OD2 → N7	2,60	ILE146
				PHE197
				VAL198
				LEU203
30	LYS176	NZ → O	2,64	TYR116
	ASP148	OD2 → N7	2,46	ILE146
				PHE197
				VAL198
				ASP204

Durante os 30 ns, os resíduos aos quais fazem pontes de hidrogênio e contatos hidrofóbicos, LYS77, ARG112, LYS114 e ARG210, se mantiveram presentes em todas as amostras coletadas, a ASP204 só não é contato hidrofóbico com a PP_i em 2 amostras porém como mostrado nas interações com a HPA, este resíduo se mantém presente em todas as amostras e com estabilidade conformacional no sistema 4, sugerindo que este resíduo tem contribuições de estabilidade com as duas regiões de ligação. Já outros resíduos como LEU76, GLY78, SER115 e TYR116 têm frequência baixa de interações com o PP_i neste monômero.

Em relação flexibilidade destes resíduos em interações com a PP_i, todos apresentam estabilidade conformacional no sistema 4 (Figura 14), reforçando a importância de todos os ligantes - HPA, PP_i e Mg - para estabilidade da estrutura, pois como visto o pirofosfato interage como ponte de hidrogênio com a ARG112 e LYS114, essas interações estabilizam a TYR116 que consequentemente proporcionam melhor estabilidade da HPA em seu sítio ativo. Isto sugere que é interessante levar em consideração os íons PP_i e Mg na busca de análogos (*docking/virtual screening*) de HPA. Da mesma forma, em primeira instância, a fixação dos resíduos 115 a 125

nesta busca, pois não é interessante que um análogo induza flutuações maiores que as observados nos sistemas 1 e 4 nesta região, com esta tática análogos com características repulsivas com esta região serão penalizados.

Tabela 4 – Interações entre o monômero A do sistema 4 e o PP_i

Tempo (ns)	Resíduos	Átomos (HGXPRT \rightarrow PP _i)	Dist. Å	C. Hidrofóbicos
0	LYS77	N \rightarrow O1	2,92	LEU76
	GLY78	N \rightarrow O2	2,89	LYS114
	ARG210	NH2 \rightarrow O3	2,92	ASP204
	ARG210	NH1 \rightarrow O3	3,13	
	TYR116	N \rightarrow O6	2,87	
	SER115	N \rightarrow O6	2,74	
	ARG112	NH1 \rightarrow O1	2,71	
5	LYS77	NZ \rightarrow O2	2,62	TYR116
	ARG210	NH2 \rightarrow O2	2,65	
	ARG210	NH1 \rightarrow O3	2,73	
	ARG112	NH1 \rightarrow O4	2,64	
	ARG112	NH2 \rightarrow O4	3,08	
	ARG112	NH2 \rightarrow O	3,02	
	LYS114	NZ \rightarrow O6	2,55	
10	LYS77	NZ \rightarrow O2	2,63	ASP204
	ARG210	NH2 \rightarrow O2	2,85	
	ARG210	NH1 \rightarrow O3	2,67	
	ARG112	NH1 \rightarrow O4	2,67	
	ARG112	NH2 \rightarrow O4	2,94	
	ARG112	NH2 \rightarrow O	2,95	
	LYS114	NZ \rightarrow O6	2,52	
15	LYS77	NZ \rightarrow O2	2,70	
	ARG210	NH2 \rightarrow O2	2,65	
	ARG210	NH1 \rightarrow O3	2,58	
	ARG112	NH1 \rightarrow O4	2,50	
	ARG112	NH2 \rightarrow O	2,83	
	LYS114	NZ \rightarrow O6	2,51	

Continua

Continuação				
Tempo (ns)	Resíduos	Átomos (HGXPRT → PP _i)	Dist. Å	C. Hidrofóbicos
20	LYS77	NZ → O2	2,66	ASP204
	ARG210	NH2 → O2	2,61	
	ARG210	NH1 → O3	2,69	
	ARG112	NH1 → O4	2,67	
	ARG112	NH2 → O4	2,87	
	ARG112	NH2 → O	2,86	
	LYS114	NZ → O6	2,65	
25	LYS77	NZ → O2	2,54	ASP204
	ARG210	NH2 → O2	2,76	
	ARG210	NH1 → O3	2,65	
	ARG112	NH1 → O4	2,59	
	ARG112	NH2 → O	2,79	
30	LYS77	NZ → O2	2,61	ASP204
	ARG210	NH2 → O2	2,59	
	ARG112	NH1 → O4	2,66	
	ARG112	NH2 → O4	2,96	
	ARG112	NH2 → O	3,02	
	LYS114	NZ → O6	2,53	

Os resultados das interações entre resíduos e ligantes obtidos pela dinâmica molecular, demonstra concordância com a estrutura cristalográfica (0 ns), pois há poucas modificações nas interações em relação a estrutura inicial e também mostra a estabilidade dos ligantes com os referidos resíduos, situação que favorece a formação de estados de transição. A estrutura cristalográfica 3OZF (HAZLETON et al., 2012) não é a única que trabalha com a *Pf*HGXPRT, Shi e colaboradores (1999) trabalharam na cristalografia da mesma em conjunto com o inibidor imucilina 5'-fosfato (ImmHP), que é um análogo de estado de transição, em conjunto com pirofosfato e magnésio. Na análise de sua estrutura cristalográfica é observável pontes de hidrogênio do inibidor com os resíduos do sítio da hipoxantina, como ASP148 e LYS176, confirmando a importância destes resíduos. Já o pirofosfato tem pontes de hidrogênio com a LYS77 e ARG210, mostrando coerência com os resultados obtidos por este trabalho. Resultados semelhantes também aparecem na estrutura cristalográfica 3OZG (HAZLETON et al., 2012) a qual é realizada com o inibidor *acyclic-immucillin phosphonates* (AIP), pirofosfato e magnésio, onde ASP148, LYS176 e VAL198 têm pontes de hidrogênio com o inibidor, e LYS77, GLY78, ARG112, SER115, TYR116 e ARG210 têm pontes de hidrogênio com o pirofosfato.

4.3 ESTABILIDADE ESTRUTURAL COM O LIGANTE AGN-PC-02OZ4C

Como prévia de mostrar a aplicação da DM na prospecção de fármacos, foi realizada a DM do sistema *Pf*HGXPRT:AGN-PC-02OZ4C:PP_i:Mg (Sistema 5), o ligante AGN-PC-02OZ4C é descrito no PUBCHEM com o código 20255442, este possui fórmula molecular C₇H₁₀N₆O (Figura 20). O ligante foi selecionado através docking molecular, realizado pelo Dr. Fernando Berton Zanchi, a partir de uma biblioteca contendo 10.000 compostos aos quais foram selecionados por similaridade estrutural com a hipoxantina. O mesmo obteve a melhor energia de ligação, e por isso foi selecionado para integrar o quinto sistema a fim de se avaliar as concordâncias entre o modelo experimental aplicando a DM em relação *docking molecular*. A primeira análise realizada foi o RMSD global e médio (Figuras 21a e 21b)

Figura 20 – Ligante AGN-PC-02OZ4C

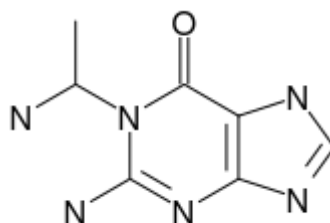
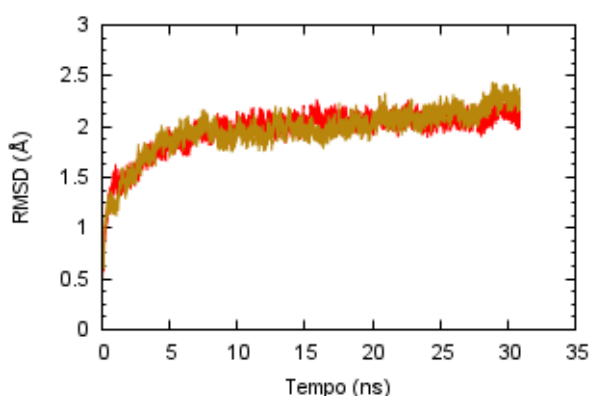


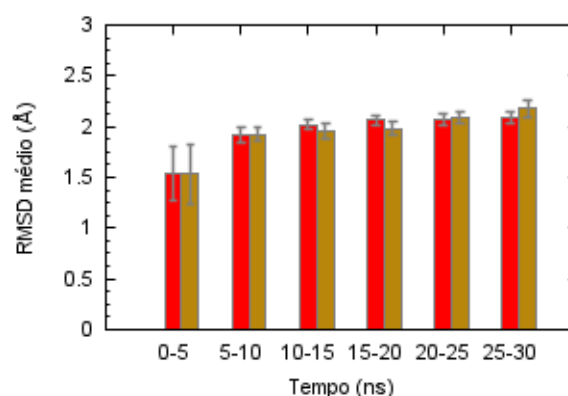
Figura demonstrando a estrutura molecular do ligante AGN-PC-02OZ4C.

Figura 21 – RMSD da *Pf*HGXPRT

(a) RMSD



(b) RMSD Médio



Figuras demonstrando o RMSD dos sistemas: Sistema 4 em vermelho; Sistema 5 em amarelo. Os valores do RMSD médio dos sistemas a cada 5 ns e seu desvio padrão é apresentando a seguir: Sistema 4 (1,53±0,27; 1,92±0,07; 2,02±0,05; 2,06±0,05; 2,07±0,05; 2,09±0,06); Sistema 5 (1,53±0,30; 1,92±0,07; 1,96±0,07; 1,98±0,06; 2,09±0,06; 2,18±0,08).

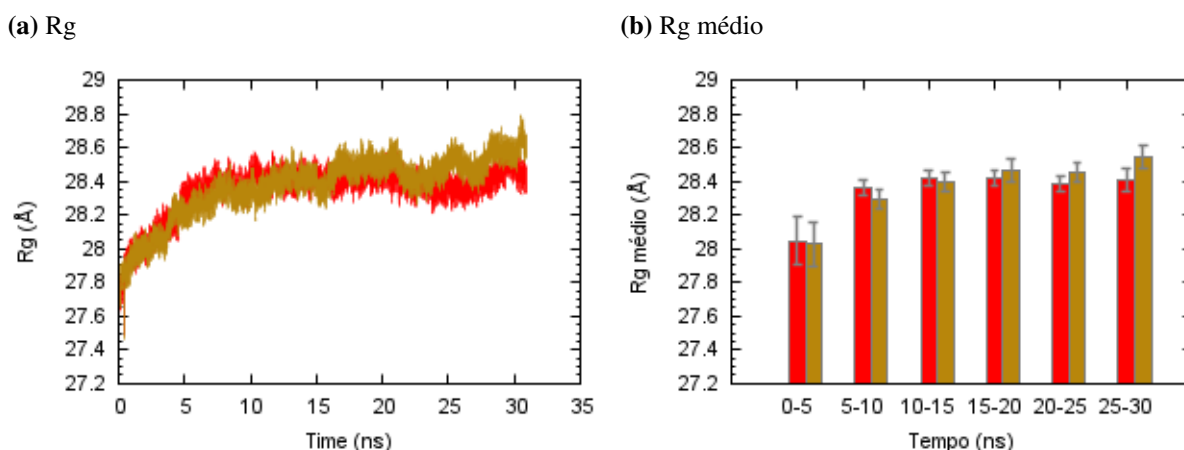
É evidente que o sistema *Pf*HGXPRT:AGN-PC-02OZ4C:PP_i:Mg é estável, e é

equiparada a estabilidade do sistema *Pf*HGXPR_T:HPA:PP_i:Mg, sugerindo que o ligante AGN-PC-02OZ4C em conjunto com PP_i e Mg, pode competir com a hipoxantina, dificultando a conversão da mesma em IMP.

Observa-se nas figuras 21a e 21b, um rápido aumento nos valores de RMSD em todos os sistemas nos momentos iniciais, porém após 5 ns observa-se uma estabilização nos valores do RMSD, e mantêm assim o restante da simulação, com comportamento semelhantes entre os sistemas.

O Rg (Figuras 22a e 22b) também mostra claramente que após 15 ns de simulação o sistema 4 é o mais estável. Apesar das oscilações observadas no Rg, na metade final, do sistema 5, o mesmo é estável conforme análise de RMSD.

Figura 22 – Raio de giro da *Pf*HGXPR_T



Figuras demonstrando o Rg dos sistemas: Sistema 4 em vermelho; Sistema 5 em amarelo. Os valores do Rg médio dos sistemas a cada 5 ns e seu desvio padrão é apresentando a seguir: Sistema 4 ($28,05 \pm 0,14$; $28,37 \pm 0,05$; $28,42 \pm 0,04$; $28,42 \pm 0,04$; $28,39 \pm 0,05$; $28,41 \pm 0,06$); Sistema 5 ($28,03 \pm 0,13$; $28,29 \pm 0,06$; $28,39 \pm 0,06$; $28,46 \pm 0,07$; $28,46 \pm 0,06$; $28,54 \pm 0,07$).

Nas figuras 22a e 22b, observa-se um aumento do Rg dos sistemas nos instantes iniciais, atingindo um platô entre 5 a 10 ns. Após 15 ns o sistema 5 sofreu oscilações em seu grau de compactação, sendo assim os ligantes presentes no sistema 4 proporcionam melhor estabilidade e maior compactação para a *Pf*HGXPR_T.

Com exceção dos resíduos iniciais, o comportamento gráfico do RMSF é similar entre os sistemas. Observa-se na figura 23 algumas regiões no sistema 5 que possuem resíduos a qual acumulam baixas variações de RMSF, como as região em torno dos resíduos 115 a 125 e 150 a 160. Isto é devido ao ligante AGN-PC-02OZ4C, que apesar de ter uma estrutura química similar a hipoxantina, tem local e modo de ligação diferente na enzima (Figura 24 e Tabela 5), inclusive com influência no modo de ligação do pirofosfato com a enzima (Tabela 6).

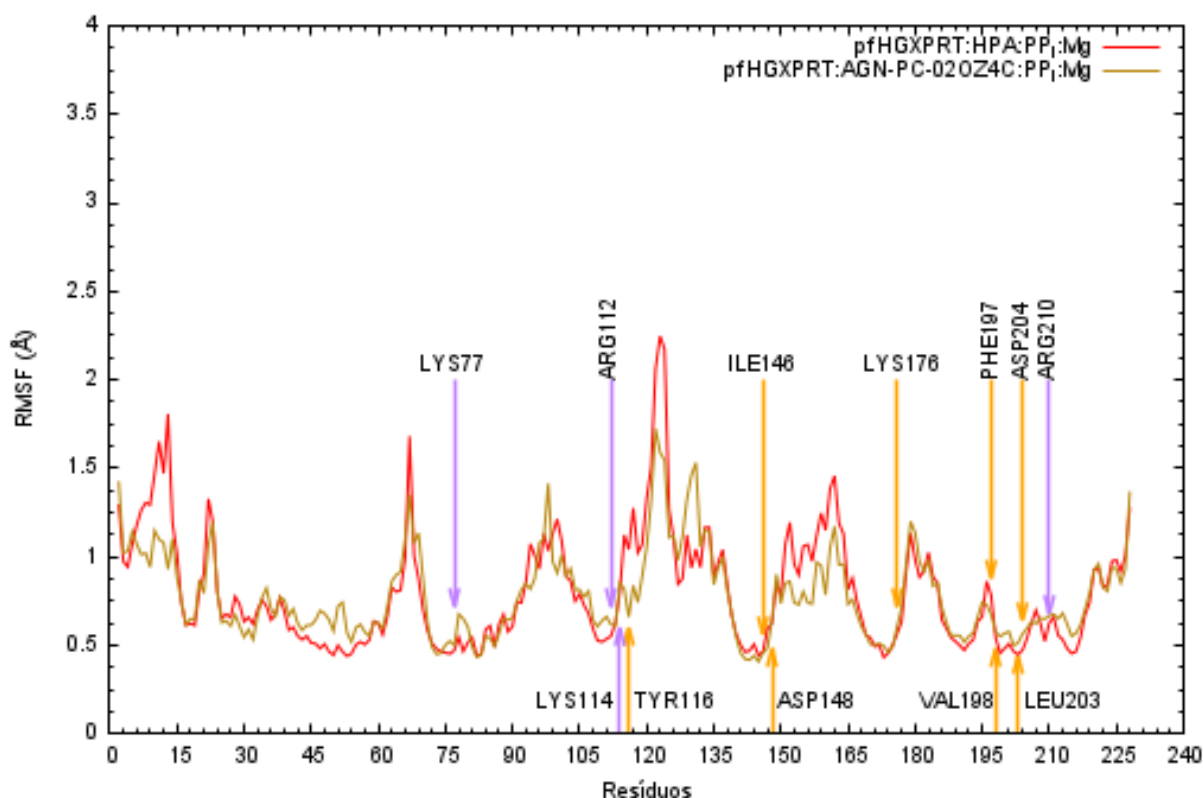
Figura 23 – RMSF da cadeia A da *Pf*HGXPRT

Figura demonstrando as flutuações espaciais dos carbonos alfa no monômero A. As flechas laranças e roxas mostram resíduos com interações com a HPA e PP_i respectivamente no sistema 4.

Conforme pode ser visto na tabela 5 o ligante AGN-PC-02OZ4C no monômero A não mantém pontes de hidrogênios constantes com a enzima, sendo a ILE146 o resíduo que com maior frequência forma pontes do hidrogênio com o ligante, seguido da SER115 e GLU144, sendo estes dois últimos, quando não formam pontes de hidrogênios são contatos hidrofóbicos do mesmo. Do outro lado existem contatos hidrofóbicos constantes que auxiliam na estabilidade do ligante como GLY78, TYR116 e ASP204. Outros contatos hidrofóbicos como LEU75, SER79 e VAL113 têm alta frequência de presença nas amostras.

Apesar da baixa quantidade de pontes de hidrogênio constantes com a enzima, o ligante AGN-PC-02OZ4C mantém uma ponte hidrogênio estável com o PP_i , de acordo com as amostras coletadas, e a distância dessa ponte oscila entre 2,45 a 2,60 Å.

Tabela 5 – Interações entre o monômero A do sistema 5 e o ligante AGN-PC-02OZ4C

Tempo (ns)	Resíduos	Átomos (HGXPRT → Lig)	Dist. Å	C. Hidrofóbicos
0	SER115	OG → N3	2,99	GLY78
	GLU144	OE1 → N5	2,84	VAL113
	ASP145	OD1 → N5	2,62	TYR116 ASP204
5	SER115	OG → N3	3,07	LEU75
	SER115	OG → O	2,74	GLY78
	GLU144	OE2 → N5	2,98	SER79
	ILE146	O → N5	2,8	VAL113 TYR116 ASP204
10	SER115	OG → N3	2,9	LEU75
	SER115	OG → O	2,8	GLY78
	ILE146	O → N5	2,85	SER79
				VAL113
				TYR116
				GLU144 LEU203 ASP204
15	SER115	OG → N3	2,97	LEU75
	SER115	OG → O	2,84	GLY78
	ILE146	O → N5	3,03	SER79
				TYR116
				GLU144
				LEU203 ASP204
20	ILE146	O → N5	2,92	LEU75
				GLY78
				SER79
				VAL113
				LYS114
				SER115
				TYR116
				GLU144
				ASP204
25	ILE146	O → N5	2,85	LEU75
	GLU144	OE2 → N5	2,86	GLY78
				SER79
				VAL113
				LYS114
				SER115
				TYR116
				ASP204

Continua

Continuação				
Tempo (ns)	Resíduos	Átomos (HGXPRT → PP _i)	Dist. Å	C. Hidrofóbicos
30	ILE146	O → N5	2,94	LEU75
	SER115	OG → N3	3,16	GLY78
	SER115	OG → O	2,65	SER79
				VAL113
				TYR116
				LEU125
				GLU144
				THR152
				LEU203
				ASP204

Figura 24 – Local de ligação da AGN-PC-02OZ4C

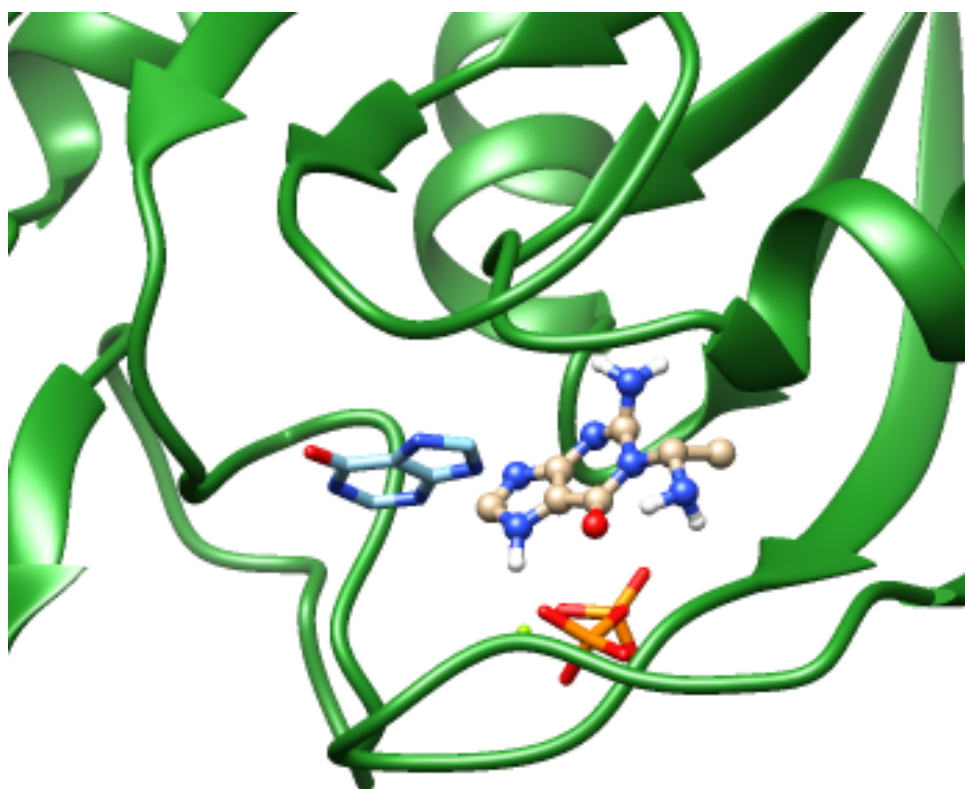


Figura demonstrando a superposição do local de ligação da AGN-PC-02OZ4C (a direita representados por bastão e esfera) em comparação a da HPA (a esquerda na forma de bastão)

A tabela 6 mostra que o ligante PP_i no sistema 5 mantém mais pontes de hidrogênios que no sistema 4, sendo os resíduos ARG112, SER115, TYR116 e ARG210 com interações constantes e LYS77 com alta frequência de formação de ponte de hidrogênio. Essas interações são

similares ao observado no PP_i do cristal 3OZG (HAZLETON et al., 2012) a qual foi cristalizado com o inibidor *acyclic-immucillin phosphonates* (AIP). Não existe contato hidrofóbico constante com o PP_i assim como no sistema 4. A ASP204 quando não é contato hidrofóbico forma uma ligação iônica com o íon magnésio, conforme as amostras, auxiliando na estabilidade do sistema já que o íon magnésio mantém ligações iônicas constantes com o PP_i .

Conforme observado anteriormente esse modo de ligação do PP_i é induzido pelo ligante AGN-PC-02OZ4C. Sendo este modo similar com o observado no sistema 4, entretanto não idêntico. A ligação do PP_i com a enzima, no sistema 5, proporciona flutuações espaciais menores na região entre os resíduos 115 a 125 (Figura 23), um efeito interessante já que estes resíduos possuem alta flexibilidade nos outros sistemas estudados (Figura 14) e provavelmente estejam envolvidos no mecanismo de recepção e liberação dos substratos e produtos respectivamente.

Tabela 6 – Interações entre o monômero A do sistema 5 e o PP_i

Tempo (ns)	Resíduos	Átomos (HGXPRT → PP_i)	Dist. Å	C. Hidrofóbicos
0	GLY78	N → O2	2,95	LEU76
	ARG210	NH2 → O1	3,19	LYS77
	ARG210	NH2 → O3	2,93	LYS114
	ARG210	NH1 → O3	3,27	ASP204
	TYR116	N → O6	2,85	
	SER115	N → O6	2,72	
	ARG112	NH1 → O1	2,68	
5	LYS77	NZ → O2	2,76	GLY78
	ARG112	NH2 → O2	2,65	ASP204
	ARG112	NH1 → O2	2,61	
	LYS114	NZ → O1	2,61	
	SER115	N → O4	2,84	
	TYR116	N → O4	2,93	
	ARG210	NH2 → O3	2,62	
10	LYS77	NZ → O2	2,75	
	ARG112	NH2 → O2	2,71	
	ARG112	NH1 → O2	3,05	
	LYS114	NZ → O1	2,9	
	LYS114	NZ → O	3,17	
	SER115	N → O4	3,03	
	TYR116	N → O4	2,73	
	ARG210	NH2 → O3	2,6	

Continua

Continuação				
Tempo (ns)	Resíduos	Átomos (HGXPRT \rightarrow PP _i)	Dist. Å	C. Hidrofóbicos
15	LYS77	NZ \rightarrow O2	2,71	GLY78
	ARG112	NH2 \rightarrow O2	2,71	GLU207
	ARG112	NH1 \rightarrow O2	2,7	
	LYS114	NZ \rightarrow O1	2,94	
	SER115	N \rightarrow O4	2,66	
	TYR116	N \rightarrow O4	2,78	
	ARG210	NH2 \rightarrow O3	2,57	
20	LYS77	NZ \rightarrow O2	2,74	ASP204
	ARG112	NH2 \rightarrow O2	2,58	
	ARG112	NH1 \rightarrow O2	2,66	
	LYS114	NZ \rightarrow O1	2,7	
	SER115	N \rightarrow O4	2,71	
	TYR116	N \rightarrow O4	2,62	
	ARG210	NH2 \rightarrow O3	2,63	
25	LYS77	NZ \rightarrow O2	2,98	
	LYS77	NZ \rightarrow O1	2,85	
	ARG112	NH1 \rightarrow O2	2,6	
	LYS114	NZ \rightarrow O1	2,63	
	SER115	N \rightarrow O4	2,68	
	TYR116	N \rightarrow O4	2,72	
	ARG210	NH2 \rightarrow O3	2,72	
30	LYS77	NZ \rightarrow O2	2,82	GLY78
	ARG112	NH2 \rightarrow O2	2,75	
	ARG112	NH1 \rightarrow O2	2,85	
	LYS114	NZ \rightarrow O1	2,83	
	LYS114	NZ \rightarrow O	3,18	
	SER115	N \rightarrow O4	2,6	
	TYR116	N \rightarrow O4	2,77	
	ARG210	NH2 \rightarrow O3	2,63	

Estudos experimentais com este ligante serão realizados no laboratório CEBIO de acordo com a disponibilidade material para execução, utilizando a técnica Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) para confirmarem as interações entre o ligante AGN-PC-02OZ4C e a *Pf*HGXPRT. Estudos cinéticos devem ser realizados a fim de confirmar o provável efeito inibitório sugerido pela análise de simulação do protocolo misto *docking molecular* e DM.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

O presente trabalho fez uso de diversas ferramentas de bioinformática e quimioinformática para caracterizar a proteína HGXPRT de *P. falciparum*. Entre elas: Gabedit, GAMESS e SwissParam para geração de arquivos de parâmetros e topologia e também obtenção de cargas parciais; NAMD para simulação de dinâmica molecular; e VMD e Chimera para manipulações na estrutura.

A DM foi utilizada para mimetizar o ambiente celular, o qual é montado numa plataforma que é composto principalmente de água, controle de temperatura, controle de pressão, e cálculos de velocidades e energias dos átomos em cada passo da simulação. Conforme diversas referências, a DM é um método que utilizam diversas técnicas, e a conclusão é que a melhor escolha depende da plataforma a qual se quer simular, como por exemplo: um complexo proteína-ligante (como é o caso da presente dissertação) é diferente do complexo proteína-membrana ou proteína-proteína.

As simulações realizadas para a *Pf*HGXPRT mostraram que uma análise de 30 ns são suficientes para obter dados sobre estabilidade, flexibilidade e interação de ligantes.

A *Pf*HGXPRT, de acordo com a DM, não perde sua estrutura secundária tanto na forma livre como na forma complexada quando inserida em meio aquoso.

A *Pf*HGXPRT em complexo com HPA, PP_i e Mg é uma proteína bastante estável em meio aquoso. Sua variação do raio de giro (Figura 13a) baixo mostra uma compactação média em torno de um centro de massa comum. Mais ainda, o RMSD (Figura 12a) apresenta menor desvio ratificando a conclusão de que a estabilidade é atingida nesta forma. O RMSF (Figura 14) mostrou que a proteína com os ligantes com HPA, PP_i e Mg tem resíduos com menores flutuações que a forma sem ligantes.

Os resultados do sistema *Pf*HGXPRT:HPA:PP_i:Mg serão utilizados como padrão para futuras simulações de dinâmica molecular com novos ligantes, selecionados em um banco de dados de compostos, através da técnica de *virtual screening* e *docking molecular*, a qual serão analisados em comparação a estabilidade, flexibilidade e energia livre antes de passarem para os testes *in vitro* como realizado na análise do sistema *Pf*HGXPRT:AGN-PC-02OZ4C:PP_i:Mg.

Os resultados simulação obtidos do sistema *Pf*HGXPRT:AGN-PC-02OZ4C:PP_i:Mg demonstram que esse conjunto de ligantes proporcionam estabilidade estrutural equiparada aos dos ligantes do sistema *Pf*HGXPRT:HPA:PP_i:Mg. Habilitando este ligante prosseguir para testes experimentais cinéticos a fim de confirmar efeitos inibitórios e retroalimentar com informações as simulações *in silico*.

Os cálculos de energias do complexo *Pf*HGXPRT:HPA:PP_i:Mg, devem ser considerados a fim de padronização de futuros trabalhos.

Referências

- ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chemical reviews**, v. 106, n. 5, p. 1589–615, maio 2006. ISSN 0009-2665.
- ALLEN, M. **Introduction to molecular dynamics simulation**. [S.l.: s.n.], 2004. ISBN 3000126414.
- ALLOUCHE, A.-R. Gabedit—a graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 1, p. 174–82, jan. 2011. ISSN 1096-987X.
- ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal research reviews**, v. 26, n. 5, p. 531–68, set. 2006. ISSN 0198-6325.
- ANDERSEN, H. C. Rattle: A “velocity” version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations. **Journal of Computational Physics**, v. 52, n. 1, p. 24–34, out. 1983. ISSN 00219991.
- ASHLEY, E. A.; RECHT, J.; WHITE, N. J. Primaquine: the risks and the benefits. **Malaria journal**, v. 13, n. 1, p. 418, nov. 2014. ISSN 1475-2875.
- AZEVEDO, W. F. de; DIAS, R. Computational methods for calculation of ligand-binding affinity. **Current drug targets**, v. 9, n. 12, p. 1031–9, dez. 2008. ISSN 1873-5592.
- BAIRD, J. K. Resistance to chloroquine unhinges vivax malaria therapeutics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 1827–30, maio 2011. ISSN 1098-6596.
- BAYLY, C. I.; CIEPLAK, P.; CORNELL, W.; KOLLMAN, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. **The Journal of Physical Chemistry**, American Chemical Society, v. 97, n. 40, p. 10269–10280, out. 1993. ISSN 0022-3654.
- BECK, D.; DAGGETT, V. Methods for molecular dynamics simulations of protein folding/unfolding in solution. **Methods**, v. 34, n. 1, p. 112–20, set. 2004. ISSN 1046-2023.
- BEEMAN, D. Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. **Journal of Computational Physics**, v. 20, n. 2, p. 130–139, fev. 1976. ISSN 00219991.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BERMAN, P. A.; HUMAN, L. Hypoxanthine depletion induced by xanthine oxidase inhibits malaria parasite growth in vitro. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 309A, p. 165–8, jan. 1991. ISSN 0065-2598.
- BERMAN, P. A.; HUMAN, L.; FREESE, J. A. Xanthine oxidase inhibits growth of *Plasmodium falciparum* in human erythrocytes in vitro. **The Journal of clinical investigation**, v. 88, n. 6, p. 1848–55, dez. 1991. ISSN 0021-9738.

- BLOLAND, P. B. **Drug resistance in malaria**. [S.l.], 2001. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/malaria.pdf>>. Acesso em: 20.11.14.
- BORHANI, D. W.; SHAW, D. E. The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 26, n. 1, p. 15–26, jan. 2012. ISSN 1573-4951.
- BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. [s.n.], 2010. 1–444 p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bolso.pdf>. Acesso em: 20.11.14.
- BRIOLANT, S.; PELLEAU, S.; BOGREAU, H.; HOVETTE, P.; ZETTOR, A.; CASTELLO, J.; BARET, E.; AMALVICT, R.; ROGIER, C.; PRADINES, B. In vitro susceptibility to quinine and microsatellite variations of the *Plasmodium falciparum* Na⁺/H⁺ exchanger (Pfnhe-1) gene: the absence of association in clinical isolates from the Republic of Congo. **Malaria journal**, v. 10, p. 37, jan. 2011. ISSN 1475-2875.
- BYAKIKA-KIBWIKI, P.; LAMORDE, M.; MAYANJA-KIZZA, H.; KHOO, S.; MERRY, C.; VAN GEERTRUYDEN, J.-P. Artemether-Lumefantrine Combination Therapy for Treatment of Uncomplicated Malaria: The Potential for Complex Interactions with Antiretroviral Drugs in HIV-Infected Individuals. **Malaria research and treatment**, v. 2011, p. 703730, jan. 2011. ISSN 2044-4362.
- CARLSSON, J.; BOUKHARTA, L.; ÅQVIST, J. Combining docking, molecular dynamics and the linear interaction energy method to predict binding modes and affinities for non-nucleoside inhibitors to HIV-1 reverse transcriptase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 2648–2656, 2008. ISSN 00222623.
- CASSERA, M. B.; HAZLETON, K. Z.; MERINO, E. F.; OBALDIA, N.; HO, M.-C.; MURKIN, A. S.; DEPINTO, R.; GUTIERREZ, J. A.; ALMO, S. C.; EVANS, G. B.; BABU, Y. S.; SCHRAMM, V. L. *Plasmodium falciparum* parasites are killed by a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase in a primate animal model. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e26916, jan. 2011. ISSN 1932-6203.
- CASSERA, M. B.; HAZLETON, K. Z.; RIEGELHAUPT, P. M.; MERINO, E. F.; LUO, M.; AKABAS, M. H.; SCHRAMM, V. L. Erythrocytic adenosine monophosphate as an alternative purine source in *Plasmodium falciparum*. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 47, p. 32889–99, nov. 2008. ISSN 0021-9258.
- CASSERA, M. B.; ZHANG, Y.; HAZLETON, K. Z.; SCHRAMM, V. L. Purine and pyrimidine pathways as targets in *Plasmodium falciparum*. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2103–15, jan. 2011. ISSN 1873-4294.
- CDC. **Biology**. 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>>. Acesso em: 19.11.14.
- CHIPOT, C. **Les méthodes numériques de la dynamique moléculaire**. Vandoeuvre-lès-Nancy, 2002. 28 p. Disponível em: <http://ecole.modelisation.free.fr/cours_chipot.pdf>. Acesso em: 20.11.14.
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N log(N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, AIP Publishing, v. 98, n. 12, p. 10089, jun. 1993. ISSN 00219606.

DARNELL, S. J. **Protein Interaction Hot Spots and Engineered Binding Affinity Within the Smad4-Ski Interface**. 140 p. Tese (Ph.D.) — University of Wisconsin at Madison, Madison, 2008.

DASSONVILLE-KLIMPT, A.; JONET, A.; PILLON, M.; MULLIÉ, C.; SONNET, P. Mefloquine derivatives : synthesis, mechanisms of action, antimicrobial activities. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. 1. ed. Badajoz-Spain: FORMATEX, 2011. cap. 3, p. 23–35.

DE MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. Métodos de Docking Receptor-Ligante para o Desenho Racional de Compostos Bioativos. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Ed.). **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. 1. ed.. ed. São Paulo: Livraria da Física, 2007. cap. 14, p. 497–499.

DI SANTI, S. M.; BOULOS, M. Protozoários – Malária. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. (Ed.). **Parasitologia humana e seus Fundamentos Gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999.

DOWNIE, M. J.; KIRK, K.; MAMOUN, C. B. Purine salvage pathways in the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 8, p. 1231–7, ago. 2008. ISSN 1535-9786.

DUCATI, R. G.; NAMANJA-MAGLIANO, H. A.; SCHRAMM, V. L. Transition-state inhibitors of purine salvage and other prospective enzyme targets in malaria. **Future medicinal chemistry**, v. 5, n. 11, p. 1341–60, jul. 2013. ISSN 1756-8927.

DUPRADEAU, F.-Y.; PIGACHE, A.; ZAFFRAN, T.; SAVINEAU, C.; LELONG, R.; GRIVEL, N.; LELONG, D.; ROSANSKI, W.; CIEPLAK, P. The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 12, n. 28, p. 7821–39, jul. 2010. ISSN 1463-9084.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC biology**, v. 9, n. 1, p. 71, jan. 2011. ISSN 1741-7007.

FAROOQ, U.; MAHAJAN, R. C. Drug resistance in malaria. **Journal of vector borne diseases**, v. 41, n. 3-4, p. 45–53, 2004. ISSN 0972-9062.

FERNANDO, D.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, S. Primaquine in vivax malaria: an update and review on management issues. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p. 351, jan. 2011. ISSN 1475-2875.

FOLOPPE, N.; MACKERELL JR., A. D. All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 86–104, jan. 2000. ISSN 0192-8651.

FRÉDÉRICH, M.; DOGNÉ, J.-M.; ANGENOT, L.; De Mol, P. New trends in anti-malarial agents. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 15, p. 1435–56, ago. 2002. ISSN 0929-8673.

FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications**. 2nd editio. ed. San Diego: Academic press, 2001. 664 p. ISSN 00319228.

GREGSON, A.; PLOWE, C. V. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 1, p. 117–45, mar. 2005. ISSN 0031-6997.

- GULLINGSRUD, J. **CatDCD - Concatenate DCD files**. 2009. <<http://www.ks.uiuc.edu/Development/MDTools/catdcd/>>. Acesso em: 25.03.15.
- HASSAN, H. F.; COOMBS, G. H. Purine and pyrimidine metabolism in parasitic protozoa. **FEMS microbiology reviews**, v. 4, n. 1, p. 47–83, fev. 1988. ISSN 0168-6445.
- HAZLETON, K. Z.; HO, M.-C.; CASSERA, M. B.; CLINCH, K.; CRUMP, D. R.; ROSARIO, I.; MERINO, E. F.; ALMO, S. C.; TYLER, P. C.; SCHRAMM, V. L.; JR., I. R.; SCHRAMM, V. L. Immucillin Phosphonates: Second-Generation Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Hypoxanthine-Guanine-Xanthine Phosphoribosyltransferase. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 6, p. 721–730, jun. 2012. ISSN 1879-1301.
- HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, set. 1997. ISSN 0192-8651.
- HILL, D. R.; BAIRD, J. K.; PARISE, M. E.; LEWIS, L. S.; RYAN, E. T.; MAGILL, A. J. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 3, p. 402–15, set. 2006. ISSN 0002-9637.
- HOOVER, W. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical Review A**, v. 31, n. 3, p. 1695–1697, mar. 1985. ISSN 0556-2791.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–8, 27–8, fev. 1996. ISSN 0263-7855.
- JERSEY, J. de; HOLÝ, A.; HOCKOVÁ, D.; NAESENS, L.; KEOUGH, D. T.; GUDDAT, L. W. 6-Oxopurine Phosphoribosyltransferase: a Target for the Development of Antimalarial Drugs. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2085–102, jan. 2011. ISSN 1873-4294.
- JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D.; IMPEY, R. W.; KLEIN, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, AIP Publishing, v. 79, n. 2, p. 926, jul. 1983. ISSN 00219606.
- KEOUGH, D. T.; NG, A. L.; WINZOR, D. J.; EMMERSON, B. T.; JERSEY, J. de. Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase and comparison with the human enzyme. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 98, n. 1, p. 29–41, jan. 1999. ISSN 0166-6851.
- KICKSKA, G. A.; TYLER, P. C.; EVANS, G. B.; FURNEAUX, R. H.; SCHRAMM, V. L.; KIM, K. Purine-less death in *Plasmodium falciparum* induced by immucillin-H, a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 5, p. 3226–31, fev. 2002. ISSN 0021-9258.
- KOEHL, P. Electrostatics calculations: latest methodological advances. **Current opinion in structural biology**, v. 16, n. 2, p. 142–51, abr. 2006. ISSN 0959-440X.
- KORSINCZKY, M.; CHEN, N.; KOTECKA, B.; SAUL, A.; RIECKMANN, K.; CHENG, Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2100–8, ago. 2000. ISSN 0066-4804.

LEMONS, D. S. Paul Langevin's 1908 paper "On the Theory of Brownian Motion"["Sur la théorie du mouvement brownien", C. R. Acad. Sci. (Paris) 146, 530–533 (1908)]. **American Journal of Physics**, American Association of Physics Teachers, v. 65, n. 11, p. 1079, nov. 1997. ISSN 00029505.

LESCH, M.; NYHAN, W. A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. **The American journal of medicine**, v. 9, n. April, 1964.

LOOAREESUWAN, S.; CHULAY, J. D.; CANFIELD, C. J.; HUTCHINSON, D. B. Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 60, n. 4, p. 533–41, abr. 1999. ISSN 0002-9637.

LOUNNAS, V.; RITSCHER, T.; KELDER, J.; MCGUIRE, R.; BYWATER, R. P.; FOLOPPE, N. Current progress in Structure-Based Rational Drug Design marks a new mindset in drug discovery. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 5, n. February, p. e201302011, 2013. ISSN 2001-0370.

LOVELL, S. C.; WORD, J. M.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. The penultimate rotamer library. **Proteins**, v. 40, n. 3, p. 389–408, ago. 2000. ISSN 0887-3585.

MACKERELL, A. D.; BASHFORD, D.; BELLOTT, M.; DUNBRACK, R. L.; EVANSECK, J. D.; FIELD, M. J.; FISCHER, S.; GAO, J.; GUO, H.; HA, S.; JOSEPH-MCCARTHY, D.; KUCHNIR, L.; KUCZERA, K.; LAU, F. T.; MATTOS, C.; MICHNICK, S.; NGO, T.; NGUYEN, D. T.; PRODHOM, B.; REIHER, W. E.; ROUX, B.; SCHLENKRICH, M.; SMITH, J. C.; STOTE, R.; STRAUB, J.; WATANABE, M.; WIÓRKIEWICZ-KUCZERA, J.; YIN, D.; KARPLUS, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **The journal of physical chemistry. B**, American Chemical Society, v. 102, n. 18, p. 3586–616, abr. 1998. ISSN 1520-6106.

MACKERELL, A. D.; FEIG, M.; BROOKS, C. L. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 11, p. 1400–15, ago. 2004. ISSN 0192-8651.

MACPHERSON, A. The Role of X-Ray Crystallography in Structure-Based Rational Drug Design. In: WEINER, D. B.; WILLIAMS, W. V. (Ed.). **Chemical and structural approaches to rational drug design**. Boca Raton - USA: CRC Press, 1994. cap. 6, p. 161–180. ISBN 9780849378188.

MAGUIRE, J. D.; SUMAWINATA, I. W.; MASBAR, S.; LAKSANA, B.; PRODJODIPURO, P.; SUSANTI, I.; SISMAADI, P.; MAHMUD, N.; BANGS, M. J.; BAIRD, J. K. Chloroquine-resistant *Plasmodium malariae* in south Sumatra, Indonesia. **Lancet**, v. 360, n. 9326, p. 58–60, jul. 2002. ISSN 0140-6736.

MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. **European journal of pharmacology**, Elsevier B.V., v. 625, n. 1-3, p. 90–100, 2009. ISSN 00142999.

MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. In: MORGON, N. H.; COUTINHO, K. (Ed.). **Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular**. 1. ed.. ed. São Paulo: Livraria da Física, 2007. cap. 12, p. 413–452.

- MBEWE, B.; CHIBALE, K.; MCINTOSH, D. B. Purification of human malaria parasite hypoxanthine guanine xanthine phosphoribosyltransferase (HGXPRT) using immobilized Reactive Red 120. **Protein expression and purification**, v. 52, n. 1, p. 153–8, mar. 2007. ISSN 1046-5928.
- MUNAGALA, N. R.; CHIN, M. S.; WANG, C. C. Steady-state kinetics of the hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase from *Tritrichomonas foetus*: the role of threonine-47. **Biochemistry**, v. 37, n. 12, p. 4045–51, mar. 1998. ISSN 0006-2960.
- NAMBA, A. M.; ALEGRE, M.; SILVA, V. D.; SILVA, C. D. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, p. 13–23, 2008.
- NOSÉ, S. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. **The Journal of Chemical Physics**, AIP Publishing, v. 81, n. 1, p. 511, jul. 1984. ISSN 00219606.
- OLIVEIRA, G. S. de. **Análise da interação molecular proteína-herbicida através de simulação computacional: aplicação no desenvolvimento de nanobiossensores**. 110 p. Tese (Doutorado) — UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2013.
- OLLIARO, P. L.; YUTHAVONG, Y. An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial drug discovery. **Pharmacology & therapeutics**, v. 81, n. 2, p. 91–110, fev. 1999. ISSN 0163-7258.
- O'NEIL, W. R. **Country malaria classification**. 2014. Disponível em: <<http://worldmalaria-report.org/node/68>>. Acesso em: 09.01.15.
- PHIL. **Malaria**. 2002. Disponível em: <<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=3405>>. Acesso em: 09.01.15.
- PHILLIPS, J. C.; BRAUN, R.; WANG, W.; GUMBART, J.; TAJKHORSHID, E.; VILLA, E.; CHIPOT, C.; SKEEL, R. D.; KALÉ, L.; SCHULTE, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781–1802, dez. 2005. ISSN 0192-8651.
- POLLOCK, E.; GLOSLI, J. Comments on P3M, FMM, and the Ewald method for large periodic Coulombic systems. **Computer Physics Communications**, 1996.
- PRICE, R. N.; NOSTEN, F. Drug resistant falciparum malaria: clinical consequences and strategies for prevention. **Drug resistance updates reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 4, n. 3, p. 187–196, 2001.
- PRICE, R. N.; UHLEMANN, A.-C.; BROCKMAN, A.; MCGREADY, R.; ASHLEY, E.; PHAIPUN, L.; PATEL, R.; LAING, K.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N. J.; NOSTEN, F.; KRISHNA, S. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. **Lancet**, v. 364, n. 9432, p. 438–47, jan. 2004. ISSN 1474-547X.
- QUEEN, S. A.; VANDER JAGT, D. L.; REYES, P. Properties and substrate specificity of a purine phosphoribosyltransferase from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 30, p. 123–133, 1988.
- RAMAN, J.; ASHOK, C. S.; SUBBAYYA, S. I. N.; ANAND, R. P.; SELVI, S. T.; BALARAM, H. *Plasmodium falciparum* hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase. Stability studies on the product-activated enzyme. **The FEBS journal**, v. 272, n. 8, p. 1900–11, abr. 2005. ISSN 1742-464X.

RAMAN, J.; SUMATHY, K.; ANAND, R. P.; BALARAM, H. A non-active site mutation in human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase expands substrate specificity. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 427, n. 1, p. 116–22, jul. 2004. ISSN 0003-9861.

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; PANIZ-MONDOLFI, A. E. Venezuela's failure in malaria control. **Lancet**, v. 384, n. 9944, p. 663–4, ago. 2014. ISSN 1474-547X.

RYCKAERT, J.-P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J.; BRUXELLES, U. L. D. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, v. 23, n. 3, p. 327–341, mar. 1977. ISSN 00219991.

SAGUI, C.; DARDEN, T. a. Molecular dynamics simulations of biomolecules: long-range electrostatic effects. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 28, p. 155–79, jan. 1999. ISSN 1056-8700.

SCHLICK, T. **Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide**. 2nd ed. ed. New York, NY: Springer New York, 2010. 723 p. (Interdisciplinary Applied Mathematics, v. 21). ISBN 978-1-4419-6350-5.

SCHMIDT, M. W.; BALDRIDGE, K. K.; BOATZ, J. A.; ELBERT, S. T.; GORDON, M. S.; JENSEN, J. H.; KOSEKI, S.; MATSUNAGA, N.; NGUYEN, K. A.; SU, S. J.; WINDUS, T. L.; DUPUIS, M.; MONTGOMER, J. A.; MONTGOMERY, J. A. General atomic and molecular electronic structure system. **Journal of Computational Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 1347–1363, nov. 1993. ISSN 0192-8651.

SCHWÖBEL, B.; ALIFRANGIS, M.; SALANTI, A.; JELINEK, T. Different mutation patterns of atovaquone resistance to Plasmodium falciparum in vitro and in vivo: rapid detection of codon 268 polymorphisms in the cytochrome b as potential in vivo resistance marker. **Malaria journal**, v. 2, p. 5, mar. 2003. ISSN 1475-2875.

SHI, W.; LI, C. M.; TYLER, P. C.; FURNEAUX, R. H.; CAHILL, S. M.; GIRVIN, M. E.; GRUBMEYER, C.; SCHRAMM, V. L.; ALMO, S. C. The 2.0 Å structure of malarial purine phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analogue inhibitor. **Biochemistry**, v. 38, n. 31, p. 9872–80, ago. 1999. ISSN 0006-2960.

SIANI, P. **Simulação por Dinâmica Molecular Modelagem e Aplicações em Terapia Fotodinâmica**. 2013. 39 p. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/paulosiani/apresentacao-no-video>>. Acesso em: 20.11.14.

SRIVASTAVA, I. K.; VAIDYA, A. B. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 6, p. 1334–9, jun. 1999. ISSN 0066-4804.

STEINBACH, P. J.; BROOKS, B. R. New spherical-cutoff methods for long-range forces in macromolecular simulation. **Journal of Computational Chemistry**, John Wiley & Sons, Inc., v. 15, n. 7, p. 667–683, jul. 1994. ISSN 0192-8651.

TEKWANI, B.; WALKER, L. Targeting the Hemozoin Synthesis Pathway for New Antimalarial Drug Discovery: Technologies for In Vitro β -Hematin Formation Assay. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, Bentham Science Publishers, v. 8, n. 1, p. 63–79, fev. 2005. ISSN 13862073.

TORRES, R. J.; PUIG, J. G. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 2, n. 1, p. 48, jan. 2007. ISSN 1750-1172.

TOXVAERD, S. Comment on constrained molecular dynamics of macromolecules. **The Journal of Chemical Physics**, AIP Publishing, v. 87, n. 10, p. 6140, nov. 1987. ISSN 00219606.

ULINE, M.; CORTI, D. Molecular Dynamics at Constant Pressure: Allowing the System to Control Volume Fluctuations via a “Shell” Particle. **Entropy**, v. 15, n. 9, p. 3941–3969, set. 2013. ISSN 1099-4300.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. A Leap-frog Algorithm for Stochastic Dynamics. **Molecular Simulation**, Taylor & Francis, v. 1, n. 3, p. 173–185, mar. 1988. ISSN 0892-7022.

VAN GUNSTEREN, W. F.; KARPLUS, M. Effect of constraints on the dynamics of macromolecules. **Macromolecules**, American Chemical Society, v. 15, n. 6, p. 1528–1544, nov. 1982. ISSN 0024-9297.

VERLET, L. Computer "Experiments" on Classical Fluids. II. Equilibrium Correlation Functions. **Physical Review**, v. 165, n. 1, p. 201–214, jan. 1968. ISSN 0031-899X.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. [s.n.], 2014. 282 p. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bioinfo/?wpdmdl=2740>>. Acesso em: 20.11.14.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein engineering**, v. 8, n. 2, p. 127–34, fev. 1995. ISSN 0269-2139.

WELLEMS, T. E.; PLOWE, C. V. Chloroquine-resistant malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 184, n. 6, p. 770–6, set. 2001. ISSN 0022-1899.

WENCK, M. A.; MEDRANO, F. J.; EAKIN, A. E.; CRAIG, S. P. Steady-state kinetics of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1700, n. 1, p. 11–8, jul. 2004. ISSN 0006-3002.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 8, p. 1084–92, abr. 2004. ISSN 0021-9738.

WHO. **Drugs used in Parasitic Diseases**. Second edi. Geneva, Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 1995. ISBN 9241401044. Acesso em: 20.11.14.

WHO. **Guidelines for the treatment of malaria**. Second edi. Geneva, Switzerland: [s.n.], 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK254223/toc/?report=reader>>. Acesso em: 20.11.14.

WHO. **World Malaria Report 2013**. Geneva, Switzerland, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/iris/bitstream/10665/97008/1/9789241564694_eng.pdf>. Acesso em: 20.11.14.

WHO. **World Malaria Report 2014**. Geneva, Switzerland, 2014a. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830_eng.pdf>.

WHO. **Status report on artemisinin resistance**. Geneva, Switzerland, 2014b. 1–7 p. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/status_rep_artemisinin_resistance_jan2014.pdf?ua=1>.

WILLIAMS, T.; KELLEY, C. **Gnuplot 4.6: an interactive plotting program**. 2013. <<http://gnuplot.sourceforge.net/>>.

WRIGHT, M. H.; CLOUGH, B.; RACKHAM, M. D.; RANGACHARI, K.; BRANNIGAN, J. A.; GRAINGER, M.; MOSS, D. K.; BOTTRILL, A. R.; HEAL, W. P.; BRONCEL, M.; SERWA, R. A.; BRADY, D.; MANN, D. J.; LEATHERBARROW, R. J.; TEWARI, R.; WILKINSON, A. J.; HOLDER, A. A.; TATE, E. W. Validation of N-myristoyltransferase as an antimalarial drug target using an integrated chemical biology approach. **Nature chemistry**, Nature Publishing Group, v. 6, n. 2, p. 112–21, fev. 2014. ISSN 1755-4349.

XU, Y.; GRUBMEYER, C. Catalysis in human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: Asp 137 acts as a general acid/base. **Biochemistry**, v. 37, n. 12, p. 4114–24, mar. 1998. ISSN 0006-2960.

YUAN, L.; CRAIG, S. P.; MCKERROW, J. H.; WANG, C. C. Steady-state kinetics of the schistosomal hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **Biochemistry**, v. 31, n. 3, p. 806–10, jan. 1992. ISSN 0006-2960.

ZANCHI, F. B. **Dinâmica Molecular das Enzimas Purina Nucleosídeo Fosforilase e Enoil Redutase de *Plasmodium falciparum*: Subsídios estruturais aplicados ao desenvolvimento de novos fármacos**. 84 p. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Rondônia, 2009.

ZOETE, V.; CUENDET, M. A.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 11, p. 2359–68, ago. 2011. ISSN 1096-987X.

APÊNDICE A – OPTIMIZE.INP HIPOXANTINA

```

! =====
! This file was generated by Gabedit
! =====

$SYSTEM MWORDS=20 TIMLIM=6000 $END
$CONTRL RUNTYP=Optimize $END
$STATPT OptTol=1e-4 NStep=1000 $END
$CONTRL SCFTYP=RHF $END
$CONTRL MAXIT=200 $END
$CONTRL ICHARG=0 MULT=1 $END
$BASIS GBASIS=N31 NGAUSS=6 $END
$CONTRL ISPHER=0 $END
$DATA
Molecule specification
C1
N  7.000000  2.058000  0.687000  -0.001000
C  6.000000  1.992000  -0.690000  -0.001000
N  7.000000  0.918000  -1.413000  -0.000000
C  6.000000  -0.259000  -0.661000  -0.000000
C  6.000000  -0.249000  0.707000  -0.000000
C  6.000000  0.936000  1.480000  -0.000000
N  7.000000  -1.559000  1.085000  -0.000000
C  6.000000  -2.300000  -0.068000  0.000000
N  7.000000  -1.534000  -1.140000  -0.000000
O  8.000000  0.982000  2.703000  -0.000000
H  1.000000  2.947000  1.164000  -0.001000
H  1.000000  2.985000  -1.167000  -0.001000
H  1.000000  -1.910000  2.033000  0.000000
H  1.000000  -3.381000  -0.062000  0.000000
$END

```

APÊNDICE B – ENERGY.INP HIPOXANTINA

```

! =====
! This file was generated by Gabedit
! =====

$SYSTEM MWORDS=20 TIMLIM=6000 $END
$CONTRL RUNTYP=Optimize $END
$STATPT OptTol=1e-4 NStep=1000 $END
$CONTRL SCFTYP=RHF $END
$CONTRL MAXIT=200 $END
$CONTRL ICHARG=0 MULT=1 $END
$BASIS GBASIS=N31 NGAUSS=6 $END
$CONTRL ISPHER=0 $END
$DATA
Molecule specification
C1
N  7.000000  2.058000  0.687000  -0.001000
C  6.000000  1.992000  -0.690000  -0.001000
N  7.000000  0.918000  -1.413000  -0.000000
C  6.000000  -0.259000  -0.661000  -0.000000
C  6.000000  -0.249000  0.707000  -0.000000
C  6.000000  0.936000  1.480000  -0.000000
N  7.000000  -1.559000  1.085000  -0.000000
C  6.000000  -2.300000  -0.068000  0.000000
N  7.000000  -1.534000  -1.140000  -0.000000
O  8.000000  0.982000  2.703000  -0.000000
H  1.000000  2.947000  1.164000  -0.001000
H  1.000000  2.985000  -1.167000  -0.001000
H  1.000000  -1.910000  2.033000  0.000000
H  1.000000  -3.381000  -0.062000  0.000000

$END

```

APÊNDICE C – PROT.PGN APOENZIMA

```
topology ../Comum/top_all27_prot_lipid.inp
pdbalias residue HIS HSE
alias atom ILE CD1 CD
segment A {pdb SegA.pdb}
segment B {pdb SegB.pdb}
segment C {pdb SegC.pdb}
segment D {pdb SegD.pdb}
coordpdb SegA.pdb A
coordpdb SegB.pdb B
coordpdb SegC.pdb C
coordpdb SegD.pdb D
guesscoord
writepsf prot.psf
writepdb prot.pdb
writepdb prot.pdb
```


APÊNDICE D – geração dos arquivos e parâmetros

Fix. do Backbone:

1. vmd > set all [atomselect top all]
2. vmd > set to_fix [atomselect top "protein and backbone"]
3. vmd > \$all set beta 0
4. vmd > \$to_fix set beta 1
5. vmd > \$all writepdb fix_prot_wb_nt.pdb

Constrangimento do Carbono Alfa:

1. vmd > set to_fix [atomselect top "protein and name CA"]
2. vmd > \$all set beta 0
3. vmd > \$to_fix set beta 0.5
4. vmd > \$all writepdb restrain_ca_prot_wb_nt.pdb

Obten. das coordenadas:

1. vmd > measure minmax \$all
2. vmd > measure center \$all

APÊNDICE E – prot_eq.conf apoenzima

structure	Comum/ prot_wb_nt . psf		
temperature	300		
paraTypeCharmm	on		
parameters	Comum/ par_all27_prot_lipid . inp		
binaryoutput	no		
firsttimestep	0		
outputEnergies	100		
outputTiming	100		
dcdfreq	100		
xstFreq	100		
wrapAll	on		
wrapNearest	on		
timestep	1.0		
nonbondedFreq	2		
fullElectFrequency	2		
stepspercycle	10		
switching	on		
switchdist	10.0		
cutoff	12.0		
pairlistdist	14.0		
rigidbonds	water		
useSettle	off		
cellBasisVector1	90.0	0.0	0.0
cellBasisVector2	0.0	95.0	0.0
cellBasisVector3	0.0	0.0	99.0
cellOrigin	0.2	−10.7	41.7
PME	on		
PMEGridSizeX	96		
PMEGridSizeY	96		
PMEGridSizeZ	108		
exclude	scaled1 −4		


```
}

#Langevin dynamics with gradual increments in temperature and with restraints
if {1} {
  outputname          Eq_Res_Heat/prot_wb_eq_res_heat
  coordinates          Eq_Min_Res/prot_wb_eq_min_res.coor
  langevin             on      ;# do langevin dynamics
  langevinDamping       5      ;# damping coefficient (gamma) of 1/ps
  langevinHydrogen      off
  ;# don't couple langevin bath to hydrogens
  langevinTemp          0
  reassignfreq          1000
  reassignTemp          0
  reassignIncr          25
  reassignHold          300
  minimize              0
  fixedAtoms            off
  run                   12000
}

#Equilibrium
if {0} {
  #Constant pressure with restraints
  outputname          Eq/prot_wb_eq
  coordinates          Eq_Res_Heat/prot_wb_eq_res_heat.coor
  extendedSystem        Eq_Res_Heat/prot_wb_eq_res_heat.xsc
  langevinPiston        on
  langevinPistonTarget  1.01325 ;# in bar -> 1 atm
  langevinPistonPeriod  200.0
  langevinPistonDecay    100.0
  langevinPistonTemp     300
  langevin              on
  langevinDamping        5
  langevinHydrogen       off
  langevinTemp           300
  minimize              0
  fixedAtoms            off
  run                   125000
  #Constant pressure without restraints
  constraintScaling      0
  run                   250000
}
```

```
#Equilibrium
if {0} {
#Constant pressure without restraints with reduced damping
constraintScaling      0
outputname              Eq_Red_Dmp/prot_wb_eq_red_damp
coordinates             Eq/prot_wb_eq.coor
extendedSystem          Eq/prot_wb_eq.xsc
langevinPiston          on
langevinPistonTarget    1.01325 ;# in bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod    200.0
langevinPistonDecay     100.0
langevinPistonTemp      300
langevin                on
langevinDamping          1
langevinHydrogen         off
langevinTemp            300
minimize                0
fixedAtoms              off
run                    500000
}
```

APÊNDICE F – prot_prod_0-2_5.conf apoenzima

structure	Comum/ prot_wb_nt . psf		
paraTypeCharmm	on		
parameters	Comum/ par_all27_prot_lipid . inp		
binaryoutput	no		
firsttimestep	0		
outputEnergies	100		
outputTiming	100		
dcdfreq	100		
xstFreq	100		
wrapAll	on		
wrapNearest	on		
timestep	1.0		
nonbondedFreq	2		
fullElectFrequency	2		
stepspercycle	10		
switching	on		
switchdist	10.0		
cutoff	12.0		
pairlistdist	14.0		
rigidbonds	water		
useSettle	off		
cellBasisVector1	90.0	0.0	0.0
cellBasisVector2	0.0	95.0	0.0
cellBasisVector3	0.0	0.0	99.0
cellOrigin	0.2	-10.7	41.7
PME	on		
PMEGridSizeX	96		
PMEGridSizeY	96		
PMEGridSizeZ	108		
exclude	scaled1-4		
1-4scaling	1.0		

```

useGroupPressure      yes
useFlexibleCell       no
useConstantArea       no

restartfreq           500      ;# 1000 steps = every 1 ps
outputPressure        100

outputname            Prod_0-2_5/prot_wb_prod
coordinates            Eq_Red_Dmp/prot_wb_eq_red_damp.coor
velocities            Eq_Red_Dmp/prot_wb_eq_red_damp.vel
extendedSystem        Eq_Red_Dmp/prot_wb_eq_red_damp.xsc

langevinPiston        on
langevinPistonTarget  1.01325 ;# in bar -> 1 atm
langevinPistonPeriod  200.0
langevinPistonDecay   100.0
langevinPistonTemp    300
langevin              on
langevinDamping        1
langevinHydrogen       off
langevinTemp          300

#####
## EXECUTION SCRIPT                                     ##
#####
#Production
run                  2500000

```

APÊNDICE G – novoscript.tcl

```

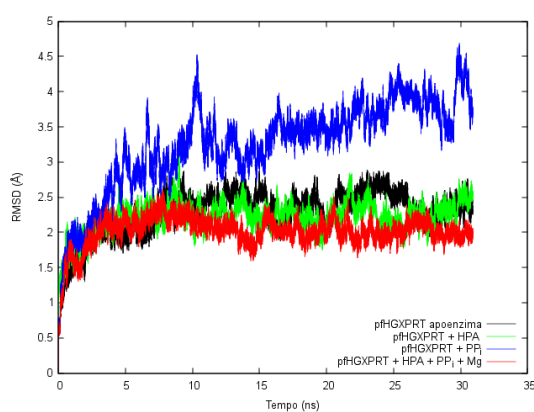
mol load psf "../prot_wb_nt.psf"
mol addfile "../prot_wb_nt.dcd" waitfor all
set outRMSD [open rmsd.dat w]
set outRMSDA [open rmsdA.dat w]
set outRMSDB [open rmsdB.dat w]
set outRMSDC [open rmsdC.dat w]
set outRMSDD [open rmsdD.dat w]
set outRGYR [open rgyr.dat w]
set outCARMSFA [open "carmsfA.dat" w]
set nf [molinfo top get numframes]
set frame0 [atomselect top "protein_and_noh" frame 0]
puts $outRGYR "[measure_rgyr_$frame0]"
set frameN [atomselect top "protein_and_noh"]
set ref [atomselect top "protein_and_backbone_and_noh" frame 0]
set sel [atomselect top "protein_and_backbone_and_noh"]
# rmsd calculation loop
set refA [atomselect top "protein_and_backbone_and_noh_and_chain_A" frame 0]
set refB [atomselect top "protein_and_backbone_and_noh_and_chain_B" frame 0]
set refC [atomselect top "protein_and_backbone_and_noh_and_chain_C" frame 0]
set refD [atomselect top "protein_and_backbone_and_noh_and_chain_D" frame 0]
for { set i 1 } { $i < $nf } { incr i } {
$frameN frame $i
$sel frame $i
puts $outRGYR "[measure_rgyr_$frameN]"
$sel move [measure_fit $sel $ref]
set selA [atomselect top "protein_and_backbone_and_noh_and_chain_A" frame $i]
set selB [atomselect top "protein_and_backbone_and_noh_and_chain_B" frame $i]
set selC [atomselect top "protein_and_backbone_and_noh_and_chain_C" frame $i]
set selD [atomselect top "protein_and_backbone_and_noh_and_chain_D" frame $i]
puts $outRMSD "[measure_rmsd_$sel_$ref]"
puts $outRMSDA "[measure_rmsd_$selA_$refA]"
puts $outRMSDB "[measure_rmsd_$selB_$refB]"
puts $outRMSDC "[measure_rmsd_$selC_$refC]"
puts $outRMSDD "[measure_rmsd_$selD_$refD]"
$selA delete
$selB delete
$selC delete
$selD delete

```

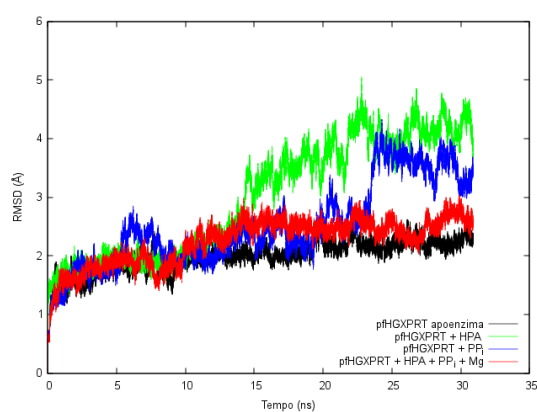


```
}  
for { set j 2 } { $j <= 228 } { incr j } {  
  set dummyA [atomselect top "protein_and_chain_A_and_name_CA_and_resid_'$j'"]  
  set VALORA [measure rmsf $dummyA]  
  puts "A_$j_=$VALORA"  
  puts $outCARMSFA "$VALORA"  
  $dummyA delete  
}
```

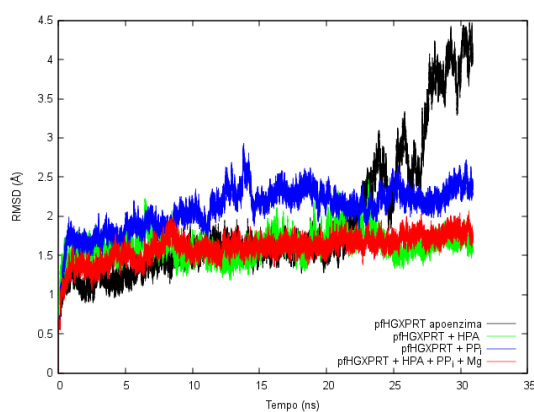
APÊNDICE H – RMSD DOS MONÔMEROS DA *Pf*HGXPRT



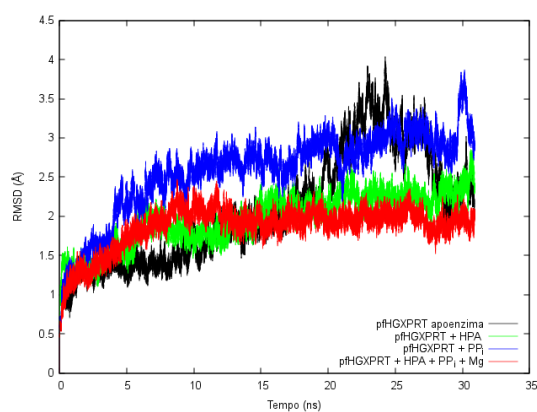
(a) Monômero A



(b) Monômero B



(c) Monômero C



(d) Monômero D

ANEXO A – MAKERESP

```
#!/bin/tcsh

# This script reads in GAMESS punch file (.dat) and creates
# RESP and ESP files to be used with the RESP program of Amber.
#
# Usage example: Anexo A
#
# makesresp test.dat
#
# where test.dat is some GAMESS puAnexo AAnexo Anch file made with
set opt=' $ELPOT IEPOT=1 WHERE=PDC OUTPUT=PUNCH $END'
# Two files will be produced as a result ,
# test.esp and test.in. These will have to be fed to RESP.
# resp -i test.in -e test.esp -o test.res

# This script was written by Dmitri G. Fedorov
# Research Institute for Computational Sciences
# National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
# Japan
# Last update: Sep 10, 2008

if($# < 1) then
    echo Usage: $0 gamess.dat
    exit 1
endif
if(! -e $1) then
    echo Input file $1 not found.
    exit 2Anexo A
endif
if('grep "POTENTIAL_COMPUTED_FOR" <$1'a == a) then
    echo Your $1 does not appear to have ESP data.
    if($1:e == dat || $1:e == DAT) then
        echo Add the line below to $1:r.inp and rerun.
        echo $opt
    else
        echo "Perhaps ,_you_are_specifying_a_GAMESS_output_(not_punch)_file?"
    endif
exit 3
```

endif

set esp=\$1:r.esp

set resp=\$1:r.in

cat <<END >\$resp

TITLE

&cntrl nmol=1, ihfree=1

&end

1.0

END

set n='grep -n "DATA" <\$1 | head -1 | cut -d: -f1 '

@ n++

sed -n -e "\$n_p" <\$1 >>\$resp

set na='grep "POTENTIAL_COMPUTED_FOR" <\$1 | tail -1 '

set ch=\$na[9]

set na=\$na[5]

echo \$ch \$na | **awk** '{ printf "%5d%5d\n", \$1, \$2 }' >> \$resp

set n='grep -n "POTENTIAL_COMPUTED_FOR" <\$1 | tail -1 | cut -d: -f1 '

@ n0 = \$n + \$na

head -n \$n0 <\$1 | tail -n \$na | **awk** '{ printf "%5d%5d\n", \$2, 0 }' >> \$resp

echo 0 | **awk** '{ printf "\n\n\n\n" }' >> \$resp

#

set npt='grep "POINTS_NPT=" <\$1 | tail -1 '

set npt=\$npt[7]

echo \$na \$npt 0 | **awk** '{ printf "%5d%5d%5d\n", \$1, \$2, \$3 }' > \$esp

head -n \$n0 <\$1 | tail -n \$na | **awk** -v s=\

'{ printf "%16c%16.7e%16.7e%16.7e\n", s, \$3, \$4, \$5 }' >>\$esp

set n='grep -n "POINTS_NPT=" <\$1 | tail -1 | cut -d: -f1 '

@ n1 = \$n + \$npt

head -n \$n1 <\$1 | tail -n \$npt | **awk** '{ printf "%16.7e%16.7e%16.7e%16.7e\n", \$5

echo RESP files were created.

echo Example of usage: resp -i \$resp -e \$esp -o \$1:r.res